HAL
open science

# Epidémiologie de l'ulcère de Buruli et de la transmission de Mycobacterium ulcerans au Cameroun : personnes, saisons, espaces et insectes

Jordi Landier

## To cite this version:

Jordi Landier. Epidémiologie de l'ulcère de Buruli et de la transmission de Mycobacterium ulcerans au Cameroun : personnes, saisons, espaces et insectes. Maladies infectieuses. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066370 . tel-01656728

**HAL Id: tel-01656728**

**https://theses.hal.science/tel-01656728**

Submitted on 6 Dec 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Epidémiologie

Ecole doctorale Pierre Louis de Santé Publique à Paris :

Epidémiologie et Sciences de l'information biomédicale

Présentée par

**Jordi Landier**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

# Epidémiologie de l'ulcère de Buruli et de la transmission de *Mycobacterium ulcerans* au Cameroun

*Personnes, Saisons, Espaces et Insectes*

Thèse dirigée par le Pr. Arnaud Fontanet et co-encadrée par le Dr. Gaëtan Texier

Préparée à l'unité d'Épidémiologie des Maladies Émergentes, Institut Pasteur, Paris, et aux services de Mycobactériologie et d'Epidémiologie-Santé Publique, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé

Soutenue publiquement le 5 Décembre 2014, devant le jury composé de :

| | |
|---|---|
| Pr Arnaud Fontanet | Directeur de thèse |
| Dr Annelise Tran | Rapporteur |
| Dr Timothy Stinear | Rapporteur |
| Pr Pierre-Yves Boëlle | Examinateur |
| Dr Didier Fontenille | Examinateur |
| Pr Olivier Bouchaud | Examinateur |

# Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Arnaud Fontanet, qui m'a orienté vers l'ulcère de Buruli pour un stage de Master, et a ensuite accepté de diriger ce travail de thèse. Arnaud, tu m'as fait confiance et laissé beaucoup d'autonomie pour mener à bien ce projet, en sachant être présent dans les moments cruciaux. Grâce à cela, je peux me prévaloir aujourd'hui d'une "vraie expérience" du monde de la recherche scientifique.

Mes remerciements vont également à Gaëtan Texier, qui a bien voulu sauter en marche dans le bateau de l'ulcère de Buruli au Centre Pasteur du Cameroun. Gaëtan, on n'aura malheureusement pas pu faire cette cohorte-fleuve, mais je crois qu'on a fait du bon travail. Tes apports sur le plan méthodologique (l'exposition au monde de l'informatique et de la modélisation aura laissé quelques séquelles), les plans de B à +∞, et les longues discussions "chez Yvette" ont été indispensables à la mise en œuvre et la maturation de ce travail.

Je remercie aussi Sara Eyangoh, pour son engagement et son rôle fédérateur dans la recherche sur l'ulcère de Buruli au Cameroun et au CPC. Sara, merci pour ton accueil tant scientifique qu'humain, et l'œil bienveillant avec lequel tu as supervisé et facilité ce travail. Je suis finalement resté "calé" bien plus longtemps qu'un stage de Master. "L'enfant" reviendra peut-être au Buruli et au pays ?

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir pris de leur temps précieux, et pour certains, d'avoir fait un long voyage, pour évaluer ce travail. Je remercie donc Annelise Tran et Timothy Stinear, Didier Fontenille, Olivier Bouchaud et Pierre-Yves Boëlle de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs et examinateurs de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous ceux qui ont accompagné ce travail à un moment ou à un autre, tout particulièrement Jean Gaudart, pour son aide dans les aspects spatiaux et temporels, Philippe Le Gall, qui m'a initié à l'entomologie de terrain, et j'espère bientôt à la Société des Princes d'Oku, Tamara Giles-Vernick, qui a bien voulu affronter les périls de l'hôtel Moabi et pencher son regard d'anthropologue sur l'environnement et les pratiques des habitants d'Akonolinga, ce qui a permis de longues et fructueuses discussions, Laurent Marsollier et son équipe, sans l'expertise et l'enthousiasme desquels l'UB serait encore plus négligé à ce jour, Pascal Boisier qui a encadré mon stage de Master au CPC, Guillaume de Magny pour l'aide apportée sur les ondelettes. Merci pour votre aide précieuse. J'ai eu la chance de trouver auprès de vous, oreilles attentives et avis éclairés !

J'ajoute des remerciements aux doctorants, étudiants et membres du projet EXTRA-MU, tout particulièrement Andrés, Jean de Matha, Solange, Kevin, Estelle, Erwan. Nous avons partagé le terrain, ses ressources et ses difficultés, partagé les données, les outils, les méthodes, les nouvelles. Le dynamisme de ces échanges a rendu ce travail plus riche et plus vivant.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues de l'Institut Pasteur et du Centre Pasteur du Cameroun, en particulier ceux de l'unité d'Epidémiologie des Maladies Emergentes à Paris, et des services de Mycobactériologie et d'Epidémiologie-Santé Publique à Yaoundé, pour leur aide et leur amitié. Une unité d'accueil, ce n'est pas seulement un bureau et une connexion internet, mais une petite famille avec qui discuter nourriture, modèles de régression et vacances, débattre de politique et de maraboutisme, trouver des idées de recherches et des solutions aux problèmes administratifs, gagner des quiz. Un grand merci donc à Yoann, Juliette, Laura, Muriel, Sylvana, Loïc, Lénaïg, Mohand, Sarah, Catherine, Fabien, Romulus, et tous les autres, ainsi que les épidémiologistes du voisinage, Magali, Clotilde, Bich-Tram, et bien sûr M. Félix, Yannick, Koro, "Igbue" Leslie, Joachim, Roger,

Josiane, Francine, ainsi que les membres du "Service de Kongossalogie" du CPC... Merci aussi à l'équipe des entomologistes de terrain, Jean-Pierre, Michael, Billy, Jean-Claude, Michel et Philippe-Emmanuel !

Merci également aux collègues de l'OCEAC et de l'IRD Cameroun, Isabelle Morlais et Parfait Awono pour le soutien logistique et la collaboration amicale qui a permis de réaliser le travail d'entomologie de terrain. Le soutien de la direction du CPC et de la représentation de l'IRD au Cameroun ont été indispensables à la réalisation de nos travaux. Merci à Joachim Etouna pour son aide sur les aspects spatiaux et à Minia Valère pour son aide quant aux aspects démographiques. Je ne peux pas oublier Laura Ciaffi, Philippe Msellati et leurs collègues du site ANRS de l'Hôpital Central, avec qui j'ai partagé de nombreux midis nourriture et nouvelles "du front". Merci à Docteur Djuma et Docteur Geneviève de MSF-Yaoundé pour les discussions fructueuses et les échanges. Merci également aux collègues de l'Institut Pasteur et de l'IRD Montpellier : Annabella Failloux, Ken Vernick, Paul Reiter, Jacques Bellalou, Michel Boussinesq…

Je remercie ma famille et les amis qui m'ont soutenu et supporté au cours de ce long travail, à Paris, Yaoundé, Montpellier, Saussan et au-delà…

# Résumé

L'ulcère de Buruli, ou infection à *Mycobacterium ulcerans*, est l'une des 17 maladies tropicales déclarées "négligées" par l'Organisation Mondiale de la Santé. L'ulcère de Buruli se manifeste par des lésions cutanées, et est responsable d'une morbidité importante parmi les populations affectées, et de lourdes incapacités chez les personnes atteintes, même après guérison. Cette maladie touche principalement des populations rurales en Afrique de l'Ouest et Afrique Centrale, où elle est présente sous forme de foyers localisés. Le mode de transmission de *M. ulcerans* à l'humain demeure une énigme, ce qui, combiné au manque de connaissances épidémiologiques, limite l'élaboration de stratégies de prévention et de contrôle de la maladie.

Les objectifs de cette thèse étaient d'identifier les différentes circonstances associées au risque d'ulcère de Buruli, et de contribuer à l'amélioration de la compréhension de la chaîne de transmission de *M. ulcerans*, à partir de l'étude de deux foyers d'ulcère de Buruli situés au Cameroun.

Ce travail a consisté en une analyse des facteurs de risque d'ulcère de Buruli à l'échelle individuelle, spatiale et temporelle. Nous avons ainsi pu confirmer l'existence d'une association entre utilisation d'une moustiquaire et un risque diminué d'ulcère de Buruli, et proposer une définition de groupes démographiques à risque. L'analyse des variations spatiales de l'incidence dans les villages du district d'Akonolinga entre 2002 et 2012 a mis en évidence la proximité du fleuve Nyong comme un facteur de risque majeur. Les paysages à risque présentaient une proportion importante de zones marécageuses, cultivées ou non, et une dégradation forte de leur couvert forestier. Enfin, l'analyse temporelle suggère que les mois de saison pluvieuse sont à haut risque d'infection.

Ces analyses ont été complétées par un travail d'entomologie de terrain afin de vérifier l'existence d'une circulation de *M. ulcerans* dans l'environnement domestique, qui n'avait jamais été étudiée dans les régions endémiques pour l'ulcère de Buruli en Afrique sub-saharienne. Nos travaux ont permis d'identifier plusieurs groupes d'arthropodes porteurs de *M. ulcerans* dans l'environnement domestique, parmi lesquels plusieurs groupes peuvent représenter des candidats vecteurs de *M. ulcerans*.

Ces travaux permettent donc de préciser l'épidémiologie de l'ulcère de Buruli au Cameroun, mais proposent également des résultats transposables à d'autres foyers endémiques en Afrique Centrale et Afrique de l'Ouest, qui présentent des environnements similaires. L'application de ces résultats sur le terrain permettrait de mieux cibler les populations, zones et périodes à risque, afin de rendre plus efficace les activités de santé publique de contrôle de l'ulcère de Buruli. Ces résultats proposent enfin de nouvelles approches pour la recherche du mode de transmission de *M. ulcerans.*

# Abstract

Buruli ulcer, a tropical disease caused by *Mycobacterium ulcerans*, was declared by the World Health Organization as one of 17 "neglected diseases". Buruli ulcer appears as cutaneous lesions, and causes severe morbidity in affected populations. Cases often suffer permanent incapacities, even after completing treatment. This disease occurs mainly in West and Central Africa, where it is found endemic in very localized regions. The transmission mode of *M. ulcerans* to humans remains mysterious, which, combined with the lack of basic epidemiological knowledge on the disease, hampers considerably the design of effective prevention and control strategies.

The goals of this thesis were to identify the different risks associated with Buruli ulcer, and to contribute to the improvement of knowledge on the circulation and transmission of *M. ulcerans*.

For this, we relied on the study of two Buruli ulcer foci located in Cameroon. We analyzed individual, spatial and temporal risk factors for Buruli ulcer. We confirmed the previously described association between the use of a bednet and a decreased risk of Buruli ulcer, and defined several demographic groups at increased risk. We analyzed the spatial variations of incidence in the villages of Akonolinga district from 2002 to 2012. We identified the Nyong River as a major risk factor, and described an increased risk in landscapes presenting important surfaces of wetlands, cultivated or not, and of degraded forests. Finally, temporal analysis suggested that the month of the high rainy season were at higher risk of infection.

We also engaged in a field entomology work in order to verify if *M. ulcerans* was circulating in the domestic environment, an hypothesis that had never been tested in African endemic regions for Buruli ulcer. Our work provided evidence that several groups of arthropods carried *M. ulcerans* in the domestic environment, among which several taxa could represent new vector candidates for *M. ulcerans*.

This work provides precisions on Buruli ulcer epidemiology in Cameroon, but several results can be transposed to other endemic regions, especially in Central or West Africa, where endemic areas present similar environments. These results could provide useful elements to design more efficient public health strategies against Buruli ulcer and to target them accurately to populations, places and persons at highest risk. These results finally suggest new leads for future research on the mode of transmission of *M. ulcerans*.

# Liste des publications

**Publications associées à la thèse**

Estelle Marion, **Jordi Landier**, Pascal Boisier, Laurent Marsollier, Arnaud Fontanet, Philippe Le Gall, Jacques Aubry, Noumen Djeunga, Alphonse Umboock, Sara Eyangoh (2011) ***Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon.*** Emerging Infectious Diseases 17: 3. 551-553. [lettre]

**Jordi Landier**, Pascal Boisier, Félix Fotso Piam, Blanbin Noumen-Djeunga, Joseph Simé, Fidèle Gaetan Wantong, Laurent Marsollier, Arnaud Fontanet, Sara Eyangoh (2011) ***Adequate wound care and use of bed nets as protective factors against Buruli Ulcer: results from a case control study in Cameroon.*** PLoS Neglected Tropical Diseases 5: 11 e1392.

**Jordi Landier**, Arnaud Fontanet, Gaëtan Texier (2014) ***Defining and targeting high-risk populations in Buruli ulcer: a challenge with clinical, epidemiological and public health relevance.*** The Lancet Global Health. [lettre, acceptée]

**Jordi Landier**, Jean Gaudart, Kevin Carolan, Danny Lo Seen, Jean-François Guégan, Sara Eyangoh, Arnaud Fontanet, Gaëtan Texier (2014) ***Spatio-temporal dynamics and landscape-associated risk of Buruli ulcer in Akonolinga, Cameroon.*** PLoS Neglected Tropical Diseases 8:9 e3123.

**Jordi Landier**, Guillaume Constantin de Magny, Andrés Garchitorena, Jean-François Guégan, Jean Gaudart, Laurent Marsollier, Philippe Le Gall, Tamara Giles-Vernick, Arnaud Fontanet, Sara Eyangoh, Gaëtan Texier (2014) ***A high-risk season for Buruli ulcer in Africa? Analysis of a ten-year cohort from Cameroon.*** [en review, Emerging Infectious Diseases]

**Jordi Landier**, Jean De Matha Ndengue, Philippe Le Gall, Jérémie Babonneau, Roger Kamgang, Erwan de Gavelle, Joachim Ossomba, Jean-Baptiste Souraud, Arnaud Fontanet, Sara Eyangoh, Laurent Marsollier, Gaëtan Texier (2014) ***First detection of Mycobacterium ulcerans in domestic Arthropods from the Buruli ulcer endemic focus of Akonolinga, Cameroon.*** [en préparation]

**Communications orales, posters**

**Jordi Landier**, Jean Gaudart, Kevin Carolan, Danny Lo Seen, Jean-François Guegan, Sara Eyangoh, Arnaud Fontanet, Gaëtan Texier. ***Space-time dynamics and landscape-associated risk of Buruli ulcer in Akonolinga, Cameroon.*** 9th Louis Pasteur conference Emerging infectious diseases, 9-11 Avril 2014, Paris. [poster]

**Jordi Landier**, Jean De Matha Ndengue, Philippe Le Gall, Jérémie Babonneau, Erwan de Gavelle, Jean-Baptiste Souraud, Arnaud Fontanet, Sara Eyangoh, Laurent Marsollier, Gaëtan Texier. ***Is Mycobacterium ulcerans exclusively transmitted in the aquatic environment? Detection of Buruli ulcer etiologic agent in the domestic Arthropods of Akonolinga, Cameroon.*** Symposium scientifique du Réseau International des Instituts Pasteur, 10-13 Septembre 2014, Paris. [communication orale]

**Autres publications sélectionnées sur l'ulcère de Buruli**

**Collaborations dans le cadre du projet EXTRA-MU**

*Anthropologie médicale*

Tamara Giles-Vernick, Joseph Owona-Ntsama, **Jordi Landier**, Sara Eyangoh (2014) ***The puzzle of Buruli ulcer transmission, ethno-ecological history and the end of "love" in the Akonolinga district, Cameroon.*** Social Science & Medicine. [accepté, disponible en ligne le 12 Mars 2014]

*Entomologie, détection de Mycobacterium ulcerans dans l'environnement*

Andrés Garchitorena, Benjamin Roche, Roger Kamgang, Joachim Ossomba, Jérémie Babonneau, **Jordi Landier**, Arnaud Fontanet, Antoine Flahault, Sara Eyangoh, Jean-François Guégan, Laurent Marsollier (2014) ***Mycobacterium ulcerans Ecological Dynamics and Its Association with Freshwater Ecosystems and Aquatic Communities: Results from a 12-Month Environmental Survey in Cameroon.*** PLoS Neglected Tropical Diseases 8: 5 e2879.

*Modélisation, écologie*

Kevin Carolan, Andres Garchitorena, Gabriel E García-Peña, Aaron Morris, **Jordi Landier**, Arnaud Fontanet, Philippe Le Gall, Gaëtan Texier, Laurent Marsollier, Rodolphe E. Gozlan, Sara Eyangoh, Danny Lo Seen, Jean-Francois Guégan (2014) ***Topography and land cover of watersheds predicts the distribution of the environmental pathogen Mycobacterium ulcerans.*** PLoS Neglected Tropical Diseases. [accepté]

Andrés Garchitorena, Calistus N. Ngonghala, **Jordi Landier**, Gaëtan Texier, Sarah Eyangoh, Laurent Marsollier, Matthew Bonds, Jean-Francois Guegan, Benjamin Roche. ***Modelling the transmission of M. ulcerans from the environment to humans.*** [en préparation]

**Collaborations hors projet EXTRA-MU**

Annick Chauty, Marie-Françoise Ardant, Laurent Marsollier, Gerd Pluschke, **Jordi Landier**, Ambroise Adeye, Aimé Goundoté, Jane Cottin, Titilola Ladikpo, Therese Ruf, Baohong Ji (2011) ***Oral treatment for Mycobacterium ulcerans infection: results from a pilot study in Benin.*** Clinical infectious diseases 52: 1. 94-96.

La liste complète des publications est présentée en Annexe 1.

# Table des matières

**Remerciements** ..... **2**

**Résumé** ..... **4**

**Abstract** ..... **5**

**Liste des publications** ..... **6**

**Table des matières** ..... **8**

**Table des figures** ..... **10**

**Liste des abbréviations** ..... **11**

**Introduction: L'ulcère de Buruli** ..... **12**

1. Epidémiologie de l'ulcère de Buruli ..... 12

1.1 *Mycobacterium ulcerans*, agent étiologique de l'ulcère de Buruli ..... 12
1.2 La transmission de *M. ulcerans* ..... 12
1.3 Physiopathologie et immunité ..... 12

2. L'ulcère de Buruli : caractéristiques médicales ..... 13

2.1 Clinique ..... 13
2.2 Diagnostic ..... 15
2.3 Traitement ..... 16
2.4 Conséquences de la maladie ..... 16
2.5 Prévention ..... 16

3. L'ulcère de Buruli, un problème de santé publique ..... 17

3.1 Une maladie tropicale touchant surtout l'Afrique sub-saharienne ..... 17
3.2 Une maladie émergente ? ..... 17
3.3 Une maladie négligée ..... 19
3.4 Impact de l'ulcère de Buruli ..... 20

4. Problématique et objectifs ..... 22

**Chapitre 1: Etat de l'art** ..... **24**

1. Epidémiologie de l'ulcère de Buruli ..... 24

1.1 Facteurs de risque de l'ulcère de Buruli ..... 24
1.2 Distribution spatiale et temporelle des cas d'ulcère de Buruli ..... 29

2. La caractérisation du réservoir environnemental de *M. ulcerans* et l'identification des mécanismes de transmission potentiels ..... 36

2.1 Méthodes de détection de *M. ulcerans* à partir des échantillons de l'environnement ..... 36
2.2 *M. ulcerans*, une bactérie environnementale à la fois ubiquiste et insaisissable ? ..... 38
2.3 Deux modèles de transmission distincts et une large part d'ombre : y a-t-il une circulation de MU dans l'environnement domestique dans les régions endémiques africaines ? ..... 45

**Chapitre 2 : Facteurs de risque individuels de l'ulcère de Buruli** ..... **48**

1. Etude des facteurs de risque d'ulcère de Buruli dans une nouvelle région endémique au Cameroun ..... 48

1.1 Caractérisation du foyer de Bankim, une zone d'émergence de l'ulcère de Buruli au Cameroun ..... 48
1.2 Etude des facteurs de risque de l'ulcère de Buruli à Bankim ..... 53

2. Contribution à la définition de groupes démographiques à risque d'ulcère de Buruli ..... 68

**Chapitre 3 : Analyses spatiales et temporelles de l'incidence d'Ulcère de Buruli dans la région endémique d'Akonolinga, Cameroun ..... 72**

1. Analyse de la distribution spatiale et spatiotemporelle de l'ulcère de Buruli, et association entre paysages et risque de maladie dans la région d'Akonolinga, Cameroun ..... 73

2. Une saison à haut risque pour l'ulcère de Buruli ? Analyse de la cohorte d'Akonolinga à la recherche de variations saisonnières dans l'incidence ..... 91

**Chapitre 4 : Une possible implication du milieu terrestre dans la chaîne de transmission ? Recherche de *Mycobacterium ulcerans* dans la faune arthropode domestique d'Akonolinga ..... 102**

**Chapitre 5 : Discussion ..... 126**

1. Progression du niveau de connaissances et du niveau de preuve sur les objectifs ..... 126

1.1 Facteurs de risque individuels, spatiaux et temporels ..... 127
1.2 Hypothèses concernant le réservoir et la transmission de MU ..... 129

2. Discussion sur les approches et les outils utilisés ..... 131

2.1 En épidémiologie ..... 131
2.2 En entomologie ..... 133

3. Impact en santé publique des résultats obtenus ..... 134

3.1 Risque d'ulcère de Buruli et stratégies de détection et de traitement précoce ..... 135
3.2 L'utilisation de zones à risque pour guider une décentralisation du traitement ..... 135
3.3 Transmission, facteurs de risque et stratégies de prévention ..... 136

4. Impact sur la compréhension de l'ulcère de Buruli ..... 136

4.1 La caractérisation de l'émergence dans le foyer de Bankim ..... 136
4.2 La caractérisation de groupes à risque d'UB ..... 137
4.3 La prise en compte de l'environnement terrestre dans la transmission de *M. ulcerans* en Afrique ..... 138
4.4 Vers un modèle actualisé de la transmission de MU ..... 140

5. Perspectives de recherches et verrous méthodologiques ..... 143

**Conclusion ..... 145**

**Bibliographie ..... 146**

**Annexes ..... 157**

Annexe 1: Liste des articles publiés sur l'ulcère de Buruli dans des revues scientifiques ..... 157

Annexe 2 : Résultats de la recherche systématiques d'articles concernant la détection de Mycobacterium ulcerans dans l'environnement (chapitre 1, partie 2) ..... 159

Annexe 3 : Matériel supplémentaire pour l'article "Wound Care, Bed Nets and Buruli ulcer in Cameroon" (Chapitre 2, partie 1.2) ..... 160

# Table des figures

Figure i : L'ulcère de Buruli, aspects microbiologiques et cliniques……14

Figure ii : Répartition géographique de l'UB à l'échelle mondiale et chronologie de son identification en Afrique sub-saharienne……18

Figure 1.1: Taux d'incidence de l'UB en fonction de la classe d'âge et du sexe……25

Figure 1.2: Micro-épidémiologie spatiale et temporelle de l'UB en Ouganda, 1970……30

Figure 1.3: Deux cartes de prévalence de l'UB dans le district d'Akonolinga au Cameroun……32

Encadré 1: détecte-t-on bien *Mycobacterium ulcerans* ?……37

Tableau 1.1 : Synthèse des résultats de détection de MU dans l'environnement aquatique……39

Tableau 1.2 : synthèse des résultats de détection de MU dans la faune des régions endémiques……41

Figure 1.4 : Variations temporelles de la présence de MU dans les échantillons de faune aquatique par type de milieu, à Akonolinga, Cameroun……42

Figure 1.5 : Modèles proposés pour la transmission de MU……47

Encadré 2.1: L'émergence de l'UB à Bankim……67

Figure 2.1: L'ulcère de Buruli et son émergence dans la région de Bankim……67

Encadré 2.2: Démographie des groupes à risque à Bankim……71

Figure 2.2 : Taux d'incidence par catégorie d'âge et par sexe pour la région de Bankim……71

Encadré 3.1: Analyses spatiales de l'incidence de l'UB dans la région de Pobè au Bénin……90

Figure 3.1 : L'ulcère de Buruli dans la région de Pobè au Bénin……90

Tableau 5.1 Grille proposée pour l'évaluation du niveau de preuve……127

Tableau 5.2 : Tentative d'évaluation du niveau de preuve de quelques facteurs de risque et hypothèses de transmission, et de la contribution du présent travail……130

Figure 5.1 : Schéma de synthèse de la présence de *M. ulcerans* dans l'environnement des régions endémiques africaines……141

Figure 5.2 : Synthèse des environnements à risque d'ulcère de Buruli selon le type de risque, lié aux activités ou à l'environnement, et la présence de MU……142

Tableau 5.3 : Hypothèses à tester, verrous, et outils nécessaires……144

# Liste des abbréviations

BAAR : Bacille Acido-Alcoolo-Résistant

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BUCREP : Bureau Central de Recensement et d'Etude de la Population au Cameroun

CDTUB : Centre de Diagnostic et de Traitement de l'Ulcère de Buruli

ER : enoyl-reductase

IS2404, IS2606 : séquences d'insertion présentes dans le génome de *M. ulcerans*

KR : kéto-reductase

M. ulcerans, M. leprae, M. tuberculosis : Mycobacterium ulcerans, leprae, tuberculosis

MU : Mycobacterium ulcerans

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : polymerase chain reaction

qPCR : PCR quantitative

SNP : polymorphisme de nucléotide unique (Single Nucleotide Polymorphism)

UB : Ulcère de Buruli

VNTR : répétitions en tandem en nombre variable (Variable Number Tandem Repeats)

# Introduction: L'ulcère de Buruli

## 1. Epidémiologie de l'ulcère de Buruli

### 1.1 *Mycobacterium ulcerans*, agent étiologique de l'ulcère de Buruli

L'ulcère de Buruli (UB) est une infection cutanée causée par *Mycobacterium ulcerans* (MU), une bactérie voisine de *Mycobacterium tuberculosis* (Figure i.A). MU est la troisième infection mycobactérienne dans les régions tropicales, après *M. tuberculosis* et *M. leprae* [1,2].

MU est une bactérie présente dans l'environnement aquatique, mais dont la localisation exacte demeure encore mystérieuse (chapitre 1, partie 2). L'UB est surtout présent dans des zones aquatiques à caractère stagnant (plaines d'inondation de fleuves, marécages) dans la quasi-totalité des zones endémiques en Afrique [1] (Figure i.B). MU est apparenté à *M. marinum*, et, comme beaucoup de mycobactéries environnementales, présente une croissante optimale à 32°C [2]. MU se distingue des autres mycobactéries par la production d'une toxine lipidique, la mycolactone, qui est largement responsable de la pathogénèse (ulcération, nécrose) par ses propriétés cytotoxiques et immuno-modulatrices [1].

### 1.2 La transmission de *M. ulcerans*

Le mode de transmission de MU à l'être humain demeure inconnu [1–4]. Les première études épidémiologiques, qui n'ont pas été démenties, concluent à l'absence d'une transmission inter-humaine [5].

Les auteurs s'accordent donc à l'heure actuelle pour considérer que l'infection par MU se fait à partir de l'environnement [1–4]. Cependant, les détails de cette transmission demeurent à l'état d'hypothèses : d'une part, les individus pourraient s'infecter par le contact entre des lésions cutanées pré-existantes et des environnements, en particulier aquatiques, contaminés par MU ; d'autre part, une inoculation de la bactérie pourrait survenir, soit par la piqûre d'un insecte porteur et potentiellement vecteur, soit par la lésion de la peau causée par un élément de l'environnement (épine, feuille…) où se développerait la bactérie [2]. Ces hypothèses ne sont d'ailleurs peut-être pas exclusives [2]. Elles sont plus ou moins étayées par les études épidémiologiques et les études biologiques de terrain et de laboratoire qui seront détaillées au chapitre 1.

### 1.3 Physiopathologie et immunité

Au cours de l'infection, MU est principalement localisé dans le tissu adipeux sous-cutané. L'action cytotoxique de la toxine contribue à détruire ce tissu, ce qui finit par provoquer la nécrose de la peau sus-jacente et l'ulcération. La bactérie ne semble que en mesure de se propager de façon systémique qu'assez rarement [2]. L'évolution de la réponse immune à MU chez les individus infectés a surtout

été décrite au niveau histopathologique dans les lésions. Une absence d'inflammation et de migration de cellules immunitaires ont été décrites dans les lésions d'UB au diagnostic, et associées en grande partie aux effets de la toxine mycolactone [6]. MU est observable sous forme d'agrégats extracellulaires, mais l'existence de stades intracellulaires transitoires a également été montrée et jouerait un rôle important dans la pathologie et la réponse immunitaire de l'hôte [7]. On observe une restauration de la réponse immunitaire lors du traitement, qui peut culminer dans un déchainement aberrant, décrit comme une réaction paradoxale [6]. Cependant, peu d'informations existent sur l'évolution de l'immunité à MU (les malades guéris sont-ils immunisés ?) ou la susceptibilité génétique qui permettraient d'expliquer les différences de survenue de la maladie entre des personnes apparemment exposées de la même manière [8,9]. L'existence d'une susceptibilité génétique doit être envisagée si l'on compare MU avec *M. leprae* et *M. tuberculosis*, deux mycobactéries pour lesquelles la survenue d'une infection symptomatique dépend beaucoup de la susceptibilité génétique des individus [10,11].

## 2. L'ulcère de Buruli : caractéristiques médicales

### 2.1 Clinique

Certains auteurs postulent que les individus habitant en zone endémique seraient largement exposés à MU, et que la plupart des contacts se résoudraient par l'élimination de l'infection par le système immunitaire, ou l'établissement d'une infection latente [2]. Les déterminants en jeu seraient la taille de l'inoculum, l'existence d'une susceptibilité génétique… Ces hypothèses n'ont cependant pas été vérifiées pour l'instant : certains individus asymptomatiques présentent des réponses immunitaires contre MU qui laissent penser qu'ils ont été en contact avec la bactérie, mais la fréquence de tels individus dans la population est mal décrite, et les mécanismes d'acquisition de cette immunité demeurent inconnus [12–15].

Les données sur l'infection par MU dont on dispose proviennent donc exclusivement de cas cliniques. Après infection, le temps d'incubation varierait entre 2 et 4,5 mois [5,16]. La maladie débute par un nodule sous-cutané, une papule, une plaque ou un œdème, qui ont pour caractéristique d'être indolores, sous l'effet de la mycolactone [17] (Figure i). Ces formes précoces, non-ulcératives, sont suivies d'une phase d'ulcération, elle aussi initialement indolore, qui peut durer plusieurs mois ou années, et atteindre les os, les tendons, les articulations. La maladie se présente sous forme localisée (nodule, ulcère de petite taille) ou sous forme disséminée (œdème, plaque, ulcère de grande taille), et peut évoluer vers une forme métastatique avec l'apparition de lésions secondaires à distance. La guérison peut être spontanée [2,18]. Les formes disséminées ont été récemment démontrées formellement comme associées à une sévérité plus grande de la maladie, avec un risque accru de

**Figure i : L'ulcère de Buruli, aspects microbiologiques et cliniques.**
A: coupe histologique d'une lésion d'UB montrant MU dans le tissu sous-cutané [19]; B : Le fleuve Nyong à Akonolinga, un environnement typique des foyers d'UB en Afrique sub-saharienne (photo JL); C-F : formes cliniques d'UB Nodule, Oedeme, Plaque, Ulcère [20]; G : Croquis de lésion réalisé en Ouganda en 1910 [9]; H-J : Séquelles d'UB [21].

séquelles après guérisons [22]. Les atteintes osseuses ont également fait l'objet d'une étude approfondie : elles surviennent chez 6 à 10% des patients, et se présentent généralement sous une lésion cutanée ou à proximité, mais dans 25% des cas sans aucune lésion cutanée [23].

**2.2 Diagnostic**

Le diagnostic est basé sur l'examen clinique des lésions et une confirmation biologique à partir d'un prélèvement cutané.

Les critères permettant à un agent de santé de suspecter qu'un patient est atteint d'ulcère de Buruli sont les suivants [2] :

- présence d'une lésion chronique depuis plusieurs semaines ou mois
- absence de fièvre ou de lymphadénopathie régionale
- lésion précoce typique : nodule, plaque indurée ou œdème
- un ou plusieurs ulcères chroniques, indolores, présentant des bords décollés ou une cicatrice "en creux"
- gonflement au niveau d'une articulation douloureuse, évocateur d'une atteinte osseuse
- patient âgé de 15 ans ou moins
- patient vivant ou ayant voyagé dans une zone endémique

Les méthodes existantes pour la confirmation biologique sont [19] :

- la recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) après coloration de Ziehl-Nielsen d'un frottis réalisé à partir d'un prélèvement au niveau de la lésion. La sensibilité de la technique varie entre 40 % et 60 %
- la mise en culture du prélèvement durant 8 semaines à 32°C sur milieu de Lowenstein-Jensen. Cette méthode aurait une sensibilité de 20 à 60 %
- l'examen histo-pathologique de biopsies, dont la sensibilité serait de 90 %
- la détection d'ADN de MU par Polymerase Chain Reaction (PCR) et PCR quantitative (qPCR). Cette dernière méthode est considérée comme la technique la plus fiable : la sensibilité serait entre 85 % et 98 %.

Dans la plupart des pays endémiques, seule la première méthode est cependant disponible en dehors des centres nationaux de référence. Les objectifs fixés récemment par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sont la confirmation de 70 % des cas [24]. Un des principaux enjeux est d'obtenir des résultats rapides et fiables qui puissent être pris en compte par le clinicien. La décentralisation du diagnostic est ainsi un défi majeur, à l'heure où certains centres de traitement dépendent encore de laboratoires européens pour le diagnostic moléculaire et la culture.

## 2.3 Traitement

Le traitement était exclusivement chirurgical jusqu'en 2004 et consistait dans l'excision large de la lésion suivie de greffes cutanées pour favoriser la cicatrisation [25]. La mise en évidence d'une efficacité de l'association streptomycine/rifampicine a conduit l'OMS à recommander l'utilisation de ces antibiotiques sur une durée de 8 semaines pour le traitement des lésions précoces [26]. Ce traitement permet d'éviter le recours à la chirurgie dans 30 à 50 % des cas. L'antibiothérapie avant chirurgie permet une réduction de la taille de la lésion et donc de l'ampleur de l'opération, et limite les rechutes suite au traitement chirurgical [27]. Un essai clinique est en cours afin de tester l'efficacité d'un traitement administré exclusivement par voie orale [28], qui simplifierait beaucoup la prise en charge et la décentralisation du traitement des cas les moins sévères, ayant des lésions peu étendues.

Le traitement est très long : aux deux mois de traitement antibiotique vient s'ajouter un délai de cicatrisation, qui peut aller de quelques semaines à plusieurs mois en fonction de la gravité et de l'étendue initiale de la lésion, et dépasser un an pour les formes les plus étendues [22,28]. En médiane, le délai de guérison était de 3 mois au Centre de Diagnostic et de Traitement de l'UB (CDTUB) de Pobè au Bénin [22]. La cicatrisation nécessite souvent des greffes de peau, qui représentent une chirurgie lourde et pratiquée principalement dans des hôpitaux de référence ou des centres spécialisés. Les formes sévères, les lésions ayant évolué sur de longues durées, ainsi que les séquelles d'UB, peuvent nécessiter des chirurgies réparatrices et reconstructrices lourdes [23]. La physiothérapie est recommandée pour tenter de limiter la survenue de séquelles permanentes [25].

## 2.4 Conséquences de la maladie

L'infection à MU est rarement mortelle et la guérison peut survenir de façon spontanée [2,18]. Les taux de rechutes observés étaient très variables d'un centre à l'autre (entre 6 et 47% des cas) lorsque l'unique traitement était chirurgical [29,30]. Ils ont fortement diminué grâce à l'antibiothérapie qui présente des taux d'efficacité supérieurs à 90 % [31]. La conséquence majeure de l'UB est la persistance de séquelles importantes après guérison (introduction, partie 3.4).

## 2.5 Prévention

La prévention de l'UB repose jusqu'à présent sur des messages généraux (port de vêtements longs au champ, soins des blessures…) élaborés à partir des principaux facteurs de risque ou de protection identifiés dans les études cas-témoins, messages dont l'efficacité n'a pas été évaluée.

Aucun vaccin efficace n'est disponible. L'efficacité du BCG a été testée en Ouganda dans les années 70, et la protection conférée avait une durée limitée à quelques mois [32]. Une étude cas-témoin n'a pas démontré d'association entre le BCG et une protection contre l'UB au Bénin [33], mais

l'observation d'une série de cas suggérait un effet protecteur contre les ostéomyélites [34]. Il est peu vraisemblable de penser qu'un vaccin sera développé à court terme : les tentatives de développer contre *M. tuberculosis* un successeur au BCG se sont jusqu'à présent soldées par des échecs malgré le nombre d'équipes et les moyens qui y sont consacrés. MU, dont la complexité en terme de vaccin est probablement similaire aux autres mycobactéries, ne bénéficie ni de la même attention ni des mêmes ressources. L'UB affecte en effet beaucoup moins d'individus que la tuberculose.

## 3. L'ulcère de Buruli, un problème de santé publique

### 3.1 Une maladie tropicale touchant surtout l'Afrique sub-saharienne

La majorité des cas recensés survient en Afrique : sur 4000 cas enregistrés par l'OMS durant l'année 2011, 95% provenaient de régions tropicales d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique Centrale [35] (Figure ii). Dans certaines régions du Bénin et de Côte d'Ivoire, le nombre de cas d'ulcère de Buruli détectés dépasse même le nombre de cas de lèpre et de tuberculose [2,3].

En Afrique sub-saharienne, les cas sont localisés principalement au voisinage des grands fleuves caractérisés par d'importantes inondations en saison pluvieuse : Nyong au Cameroun, Zou et Ouèmé au Bénin, Nil en Ouganda. Il en est de même en Guyane [4,25].

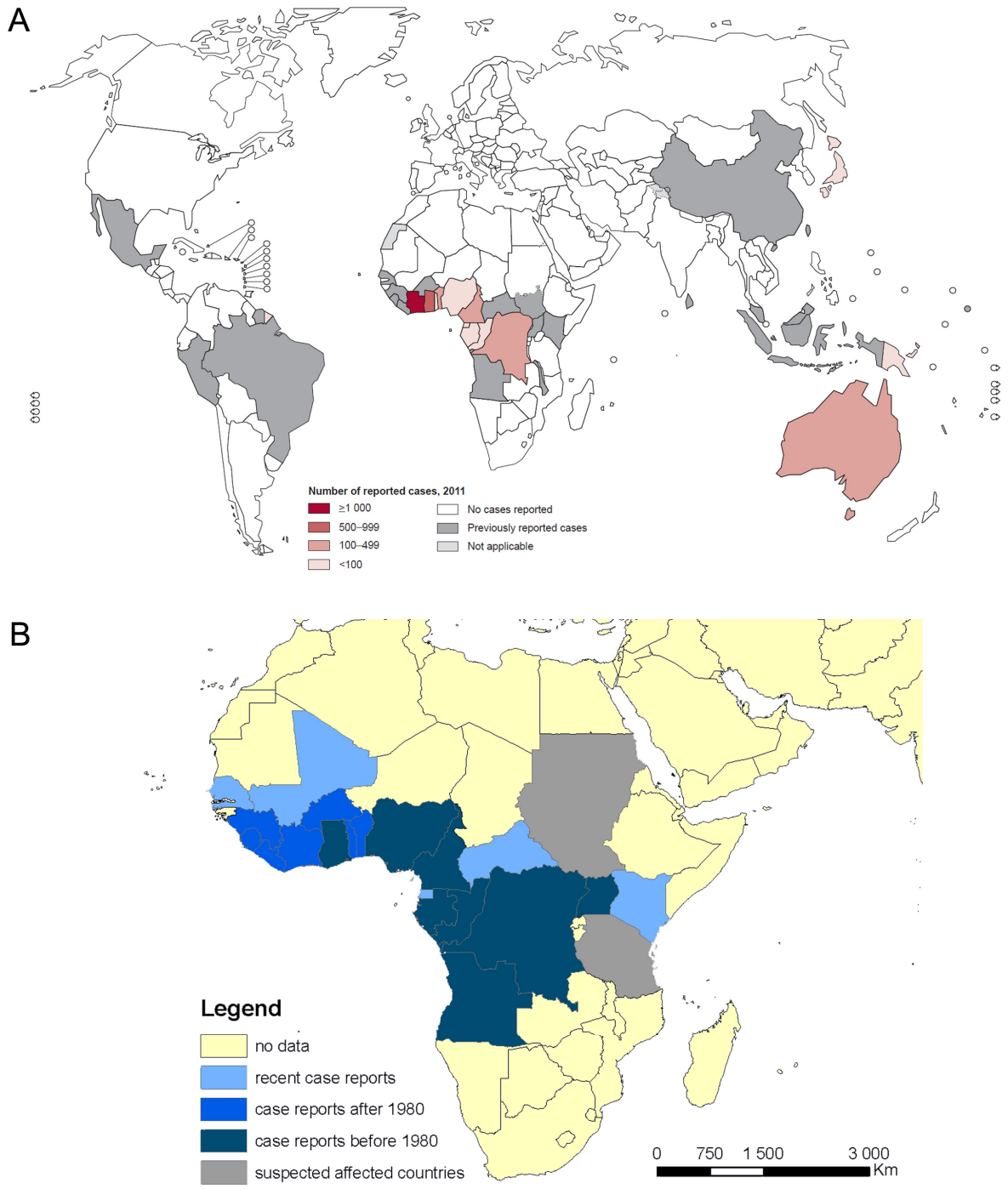
Hors du continent africain, le foyer endémique d'UB de la Bellarine Peninsula, près de Melbourne, en Australie, est situé sous des latitudes tempérées, dans une zone péri-urbaine résidentielle, et ne présente aucune de ces caractéristiques. De même, le Japon compte quelques cas annuels d'UB en zone tempérée, mais sans description d'un foyer caractérisé.

### 3.2 Une maladie émergente ?

Des cas d'UB ont été observés et décrits en Ouganda et au Congo aux débuts du XXe siècle et MU a été isolé en Australie en 1948. Un certain nombre de foyers ont par la suite été décrits : au Cameroun en 1969 [36], au Ghana en 1971 [37], au Nigeria en 1976 [38], en Côte d'Ivoire en 1978 [24].

Une augmentation importante du nombre de cas enregistrés, et du nombre de pays concernés a été constatée à partir des années 80 (Figure ii). Cette augmentation ne semble pas uniquement liée à une plus grande attention portée à l'UB sous l'impulsion de l'OMS qui l'a classé en 1998 parmi les maladies négligées. Il semble que la maladie soit apparue récemment dans certaines régions [12,39–41]. Certains auteurs estiment que des changements environnementaux, tels que la création de lacs, la riziculture, la déforestation favorisent l'apparition de nouveaux foyers [42]. A l'inverse la construction d'un barrage sur un fleuve de Guyane aurait eu pour effet, en régulant le débit du fleuve, de favoriser la diminution du nombre de cas d'UB au bord du fleuve en aval du barrage [43]. Durant les dernières années, une augmentation du nombre de cas a été décrite au Gabon et en

Australie, mais l'incidence semble diminuer dans les principaux pays endémiques, comme au Bénin, au Ghana et au Cameroun [35,44], sans que l'on sache expliquer les raisons de ces variations.




**<u>Figure ii : Répartition géographique de l'UB à l'échelle mondiale et chronologie de son identification en Afrique sub-saharienne.</u>**
A: cas déclarés à l'OMS en 2011 [44]. B: pays d'Afrique sub-saharienne déclarant des cas d'UB en fonction de la période d'identification de la maladie (JL).

### 3.3 Une maladie négligée

L'UB fait partie d'un groupe de 17 maladies tropicales, définies comme "négligées" par l'OMS. Bien que d'origines diverses, ces maladies ont en commun de sévir principalement dans des populations en situation de pauvreté, n'ayant qu'un faible accès aux services de santé et d'éducation. Ces maladies sont souvent mal documentées et certaines sont stigmatisées, ce qui contribue à en masquer davantage les impacts. Elles ne figurent donc pas parmi les priorités des programmes nationaux de santé publique. Même si elles affectent près d'un milliard de personnes dans le monde, ces maladies sont de plus peu visibles sur le plan international, car elles invalident plus qu'elles ne tuent, et sont considérées comme des problèmes résolus dans beaucoup de régions du monde dont elles ont disparu [45].

L'UB est d'abord une maladie négligée sur le plan de la santé publique. Certains pays, dont le Cameroun, s'appuient très fortement sur des Organisations Non Gouvernementales (ONG) internationales pour le dépistage, la prise en charge thérapeutique et son financement, car les programmes nationaux de lutte contre l'UB bénéficient de moyens restreints. Même au niveau international, l'objectif affiché pour l'UB par le 2$^{e}$ rapport sur les Maladies Tropicales Négligées est "de guérir 70 % des cas" [44] et la stratégie de réduction de la morbidité passe par le diagnostic et la prise en charge précoce des cas [24]. Ces objectifs et moyens modestes contrastent, par exemple, avec les ambitions affichées d'élimination de l'onchocercose ou du pian [44].
De plus, le nombre de cas est très probablement sous-estimé et la distribution des cas n'est bien caractérisée à aucune échelle géographique [44]. Au Congo, une enquête transversale récente dans une zone endémique montrait que seuls 6 % des cas d'UB actifs avaient été enregistrés dans une structure de santé de leur zone d'habitation [46]. Une situation similaire avait été décrite au Cameroun [47]. A l'échelle d'un pays comme le Cameroun, des cas sporadiques sont identifiés en provenance de régions variées, ce qui indique que seuls ont été identifiés les foyers dont le nombre de cas est suffisamment élevé pour être perçu en l'absence d'un système de surveillance [40]. A l'échelle mondiale, le Nigéria, pays de 170 millions d'habitants frontalier du Bénin et du Cameroun, deux pays endémiques, ne déclare qu'une dizaine de cas d'UB par an, alors que le Centre de Diagnostic et de Traitement de l'UB (CDTUB) de Pobè, au Bénin, traite chaque année plus de 20 patients nigérians venant des seules localités frontalières avoisinantes [22]. Il en est de même à l'hôpital de Bankim, au Cameroun, qui traite chaque année environ 5 patients venus du Nigeria voisin (Eyangoh S, données non publiées).

L'UB est une maladie négligée en termes d'outils de traitement : il a fallu attendre 2005 pour qu'une étude permette à l'OMS de recommander la généralisation de l'antibiothérapie Streptomycine-

Rifampicine [26,27]. Le traitement reste complexe et implique des injections quotidiennes, ce qui conduit à l'hospitalisation de la plupart des cas pour garantir le suivi du traitement. L'essai clinique d'un traitement par voie orale n'a commencé qu'au cours des dernières années [44]. Il s'agit pourtant d'une priorité afin de favoriser l'accès au traitement par sa décentralisation.

Le manque d'outils de traitement, la complexité de la prise en charge et l'absence d'une compréhension fine de l'épidémiologie de l'UB empêchent l'élaboration de stratégies efficaces de lutte permettant non seulement d'optimiser le diagnostic et le traitement précoces, mais aussi de développer une prévention ciblée en fonction des niveaux de risque, et d'améliorer le contrôle de la maladie.

L'UB est enfin une maladie négligée en termes d'accès au diagnostic et au soin [24]. La maladie sévit principalement dans des populations rurales, où le niveau d'éducation est faible, l'accès aux soins difficile et les moyens dédiés à la surveillance limités. L'implication de membres de la communauté apparait comme une possibilité opur mieux surveiller et dépister les cas précocement [48]. La reconnaissance de l'UB comme une maladie relevant du "monde médical" est également un enjeu : dans beaucoup de régions endémiques, la maladie est bien identifiée mais elle est perçue comme d'origine mystique par les populations [49–51]. Cette interprétation et la méfiance des populations vis-à-vis des structures de santé gouvernementales entraîne des itinéraires thérapeutiques tortueux, et une prise en charge tardive à l'hôpital [50–52].

## 3.4 Impact de l'ulcère de Buruli

### *3.4.1 Morbidité et mortalité, handicap*

L'infection par MU reste généralement localisée chez les malades, et n'évolue pas vers une atteinte systémique. Ainsi, les décès sont principalement dus à des surinfections (septicémies, tétanos) [2]. Les séquelles, comme les contractures, les déformations articulaires, les atteintes des tendons ou des os, qui peuvent se solder par des amputations, sont relativement fréquentes : l'UB entraîne des incapacités fonctionnelles dans 50% des cas en l'absence de prise en charge [2] (Figure i). Bien qu'ayant été traités dans un des centres les plus expérimentés dans la prise en charge de l'UB, environ 20 % des patients du CDTUB de Pobè présentent des séquelles fonctionnelles un an après la fin de leur traitement [22]. La survenue de ces séquelles est associée aux atteintes osseuses (ostéomyélites), aux lésions de grande taille (diamètre >15cm), aux lésions multifocales, ainsi qu'aux lésions œdémateuses [22].

### ***3.4.2 Impact économique et social***

Les conséquences socio-économiques sont également considérables pour les familles touchées par la maladie : pertes de revenus liés à l'incapacité de travailler du malade mais aussi, lorsque les patients sont des enfants, du « garde-malade » qui l'accompagne durant son séjour à l'hôpital, coûts liés à la prise en charge malgré sa gratuité (transports, repas…) [53]. La durée longue du traitement s'accompagne d'un risque d'isolement des malades, qui vient s'ajouter à un certain degré de stigmatisation de la maladie, qui est interprétée comme d'origine occulte, "lancée" notamment en représailles de vol de récoltes.

D'autre part, la guérison avec séquelles est également associée à un coût permanent pour l'individu en termes de capacité de travail, dans des régions rurales où l'agriculture ou la pêche sont les principales activités de subsistance [54].

Dans les études globales, y compris celles consacrées aux maladies tropicales négligées, le « fardeau épidémiologique » (burden of disease) imposé par l'UB n'est pas quantifié de façon individualisée [55]. En effet, le nombre de cas déclaré est trop faible pour être pris en compte dans ce genre de travaux.

### ***3.4.3 Un aperçu des recherches scientifiques et cliniques sur l'ulcère de Buruli***

Une recherche des articles publiés dans la littérature scientifique et référencés sur PubMed sous les mots-clés ("Buruli" OU "Mycobacterium ulcerans" OU "M. ulcerans") donnait 911 résultats avant Janvier 2014. Sur ces 911 articles, 107 ne portaient pas directement sur MU, 90 étaient "à propos d'un cas", 67 étaient des points de vue ou des commentaires et 91 représentaient des revues de la littérature, plus ou moins spécialisées.

Les 556 articles de recherche originale correspondaient aux domaines suivants :

- la recherche clinique (20 %, portant principalement sur des essais cliniques et des études de l'immunologie de la réponse des patients au traitement),
- la confirmation biologique du diagnostic (10 %, portant sur le développement d'outils PCR, qPCR, d'algorithmes séquentiels…),
- la biologie de MU au laboratoire (25 %, principalement immunologie, essai de traitements antibiotiques chez la Souris, biochimie de la mycolactone)
- la génomique de MU (10 %)
- la détection environnementale de MU (10 %, en grande majorité dans l'environnement aquatique en Afrique sub-saharienne et dans l'environnement terrestre en Australie)
- les aspects socio-économiques et anthropologiques de l'UB (5 %)
- l'identification de nouveaux foyers ou la description de données nationales (5 %)

- l'épidémiologie de MU (10 %, principalement des études descriptives transversales, rarement des analyses (cas témoins)). Plusieurs de ces travaux, y compris la seule étude quasi-prospective réalisée dans le camp de réfugiés de Kinyara, ont été réalisés dans les années 70 en Ouganda.

Au vu de cet aperçu, certes schématique, plusieurs tendances émergent : d'une part, le souci de développer et d'améliorer le diagnostic et le traitement de l'UB est réel, et a porté ses fruits au cours des dix dernières années; d'autre part, une recherche fondamentale s'est développée autour d'un organisme aussi atypique que MU, orientée principalement vers l'immunologie et un hypothétique vaccin, mais qui a également permis d'identifier par exemple de nouvelles cibles pour des antalgiques [17]. Un champ de recherches alliant terrain et modélisation autour de l'écologie du pathogène s'est également développé. A l'inverse, la compréhension de l'épidémiologie de la maladie est restée stagnante, limitée à la description de facteurs de risque et de la prévalence à l'échelle régionale ou nationale. Plusieurs explications peuvent être avancées : le manque de données et le manque d'outils est probablement en cause mais aussi le manque d'épidémiologistes impliqués dans l'étude de l'UB : les publications récentes sont principalement le fait de cliniciens et de biologistes, à l'inverse de l'Ouganda dans les années 70 où l'épidémiologiste David Barker a fait ses premières armes.

## 4. Problématique et objectifs

L'UB a longtemps été négligé, au même titre que d'autres maladies "du bout de la route" : il touche des populations relativement isolées, dont l'accès aux soins est faible et les moyens économiques limités. La prise en compte de cette maladie par les programmes de santé publique des pays concernés reste minimale. L'élaboration de stratégies de contrôle et de prévention est extrêmement limitée par le manque de connaissances épidémiologiques sur cette maladie : la chaine de transmission de MU à l'être humain demeure inconnue, de même que les circonstances dans lesquelles a lieu l'infection. La survenue de l'UB et le mode de transmission de MU représentent aussi une énigme scientifique telle qu'il en reste peu dans le domaine des maladies infectieuses au XXIe siècle, et on dispose aujourd'hui de techniques statistiques, informatiques et biologiques extrêmement performantes pour tenter de comprendre la transmission de MU.

La compréhension de la chaine de transmission de MU, de son ou ses réservoirs environnementaux jusqu'aux patients nécessite de recourir à différentes approches afin d'accumuler des éléments de réponse et vérifier les critères de causalité énoncés par Hill [56] : Quels sont les facteurs de risque de l'infection par MU ? Quels en sont les déterminants spatiaux et temporels ? Où se trouve le réservoir

environnemental de MU ? Les approches épidémiologiques peuvent-elles guider efficacement la recherche de MU dans l'environnement ? Les résultats obtenus dans un foyer endémique peuvent-ils être généralisés ?

La problématique de cette thèse se situe donc au carrefour entre recherche fondamentale et santé publique, car l'amélioration des connaissances sur MU, sa transmission et son épidémiologie, est un préalable au développement de stratégies de santé publique de lutte efficace contre l'UB.

Les objectifs spécifiques sont :

- L'identification des facteurs de risque individuels dans un foyer d'émergence de l'ulcère de Buruli au Cameroun. Il s'agissait en particulier de vérifier l'association nouvellement décrite entre utilisation d'une moustiquaire et protection contre l'ulcère de Buruli. Ce travail a permis la comparaison avec une zone endémique "ancienne", et a été l'occasion de revenir sur la définition de groupes démographiques à risque.

- L'identification des environnements et des périodes à risque en zone d'endémie, par l'analyse de la distribution et de la dynamique spatiale et temporelle des cas d'ulcère de Buruli à l'échelle d'un territoire.

- La vérification de l'hypothèse d'une circulation de MU dans l'environnement domestique par des collectes des faunes entomologiques domiciliaires et péri-domiciliaires.

Au chapitre 1, nous présenterons l'état des connaissances ayant conduit à formuler ces objectifs, autour de deux parties, un approfondissement de l'épidémiologie de MU esquissée en introduction, et une revue détaillée de la littérature concernant la recherche d'un réservoir environnemental de MU et concernant les mécanismes possibles de sa transmission à l'être humain. Les chapitres 2 à 4 développeront successivement la façon dont les trois objectifs spécifiques ont été atteints, avant de mettre ce travail en perspective avec les besoins en termes de santé publique et de recherche dans la discussion proposée au chapitre 5.

# Chapitre 1: Etat de l'art

## 1. Epidémiologie de l'ulcère de Buruli

Les données épidémiologiques dont on dispose sur l'UB peuvent être classées en trois grandes catégories : les informations obtenues à partir de l'analyse du nombre de cas selon quelques catégories, éventuellement comparées à la population générale, les informations obtenues sur les facteurs de risque comportementaux par les enquêtes cas-témoins, et les données plus générales sur la répartition spatiale et temporelle de la maladie, obtenues principalement à partir d'études de prévalence (enquêtes transversales ou registres).

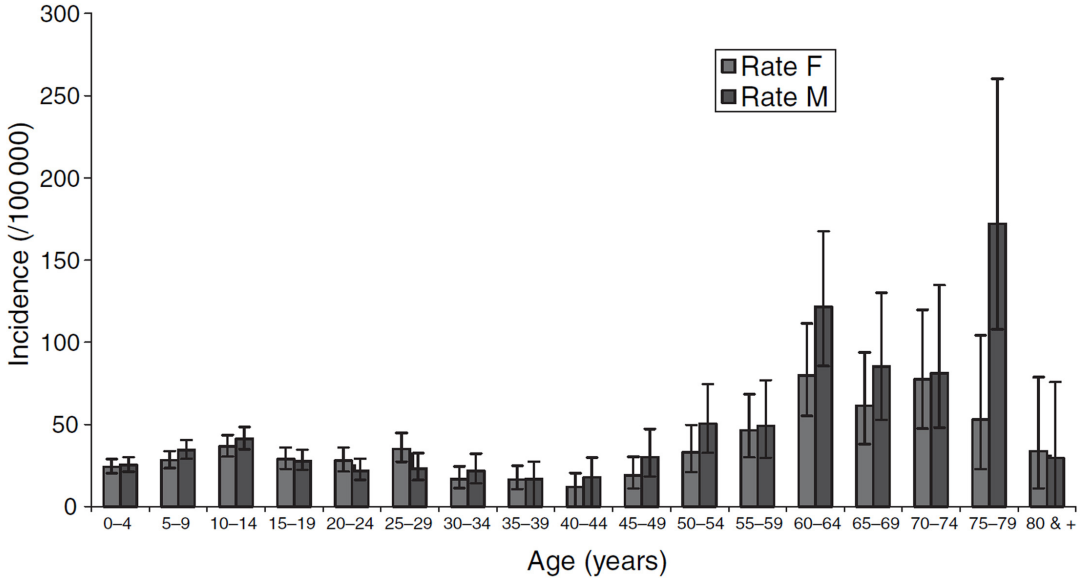
### 1.1 Facteurs de risque de l'ulcère de Buruli

#### *1.1.1 Démographie et caractéristiques individuelles des groupes à risque*

Les cas d'UB recensés sont en majorité âgés de 5 à 20 ans environ [22,57–59], et il ne s'agit pas uniquement du reflet de la pyramide des âges en Afrique sub-saharienne où se situent la plupart des zones endémiques. En effet, si beaucoup d'observations sont faites sur des nombres de cas [58,59], quelques études reposant sur le calcul de taux d'incidence confirment cette observation : ces taux sont plus élevés chez les enfants que chez les adultes [5,57,60]. Les personnes âgées de plus de 60 ans, même si elles ne représentent que peu de cas, ont des taux d'incidence semblables à ceux des enfants (Figure 1.1). Ce résultat a été interprété par certains auteurs comme la probable réactivation d'infections antérieures suite à l'affaiblissement du système immunitaire [57], mais aucun résultat n'est venu confirmer ou infirmer cette hypothèse.

La maladie touche autant les hommes que les femmes, mais les deux sexes ne semblent pas affectés au même âge (Figure 1.1) [5,22,34,59]. Les enfants jusqu'à 8-10 ans présentent globalement des taux d'incidence similaires chez les garçons et les filles. Un pic s'observe chez les garçons entre 10 et 15 ans, avant que le taux d'incidence ne décroisse entre 15 et 60 ans, pour augmenter à nouveau après [5,57]. Chez les femmes, on n'observe pas de pic d'incidence entre 10 et 15 ans, mais plutôt le maintien d'une incidence élevée chez les femmes entre 15 et 50 ans. Des hypothèses ont été faites sur l'implication potentielle de mécanismes hormonaux, mais cela est interprété par la plupart des auteurs comme la traduction d'expositions différentes aux environnements à risque [22]. Cependant, peu d'études présentent des résultats concluants liés à l'âge. Les auteurs ne disposent pas souvent des effectifs de la population par classe d'âge permettant le calcul de taux d'incidence pour chaque classe.

A




B

TABLE I. Total incidence of Buruli lesions in Kinyara by age and sex. January 1966–January 1970.

| Age* | Males | | | Females | | | Total | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | No. of Cases | Pop. | Incidence % | No. of cases | Pop. | Incidence % | No. of cases | Pop. | Incidence % |
| 0– | 2 | 65 | 3·1 | 3 | 56 | 5·4 | 5 | 121 | 4·1 |
| 1– | 11 | 86 | 12·8 | 3 | 88 | 3·4 | 14 | 174 | 8·0 |
| 3– | 8 | 82 | 9·8 | 9 | 63 | 14·3 | 17 | 145 | 11·7 |
| 5– | 35 | 165 | 21·2 | 22 | 177 | 12·4 | 57 | 342 | 16·7 |
| 10– | 32 | 193 | 16·6 | 24 | 161 | 14·9 | 56 | 354 | 15·8 |
| 15– | 11 | 111 | 9·9 | 16 | 141 | 11·3 | 27 | 252 | 10·7 |
| 20– | 4 | 83 | 4·8 | 7 | 84 | 8·3 | 11 | 167 | 6·6 |
| 25+ | 7 | 501 | 1·4 | 26 | 460 | 5·7 | 33 | 961 | 3·4 |
| Total | 110 | 1286 | 8·6 | 110 | 1230 | 8·9 | 220 | 2516 | 8·7 |

* Ages as determined at census in May 1967. Incidence for infants relatively overstated. 2 of the 5 were more than 12 months old at the onset of symptoms.

**<u>Figure 1.1: Taux d'incidence de l'UB en fonction de la classe d'âge et du sexe.</u>**
A: Département du Zou, au Bénin [57]; B: Camp de réfugiés de Kinyara, Ouganda [5]

Les études cas-témoins représentent la méthodologie le plus souvent utilisée pour l'étude des facteurs de risque de l'UB : il s'agit de comparer des malades (cas) et des non-malades (témoins, représentatifs de la population).

Quatre études cas-témoins ont été réalisées sans appariement sur l'âge et le sexe [61] mais seule l'une d'entre elles permet de quantifier le risque relatif associé à l'âge et comment il se combine avec les autres facteurs de risque [62]. Parmi les enfants de moins de 5 ans, le risque augmente chez les 3-4 ans comparés aux enfants de deux ans ou moins. Chez les personnes de plus de 5 ans, le risque était augmenté chez les enfants entre 5 et 9 ans, et entre 10 et 14 ans, et diminué entre 30 et 49 ans. Les enfants d'âge scolaire et les cultivateurs présentaient des risques augmentés. Chez les femmes, le risque était le même quel que soit l'âge, chez les hommes, les jeunes garçons avaient un risque plus élevé. Cette répartition reproduit les observations faites à partir des distributions de l'incidence [62]. D'autre part, l'utilisation de sources d'eau non protégées, et en particulier l'utilisation de marécages, était associée à un risque plus élevé quelle que soit la catégorie d'âge [62].

L'hypothèse d'une association avec le VIH a été faite initialement à partir d'une étude réalisée au Bénin [63], mais cette association n'avait pas été retrouvée au Ghana [59]. Le nombre de cas de VIH dans ces études était très faible. Aucune étude systématique n'a pour l'heure été publiée qui permette de considérer l'infection par MU comme une infection opportuniste. Les deux épidémies se recoupaient initialement assez peu en termes de géographie car l'infection par le VIH est plutôt urbaine en Afrique de l'Ouest et l'UB plutôt rural. En termes de sexe et classes d'âge, la population la plus à risque serait celle des jeunes femmes, concernées par les deux infections. Au Cameroun, la prévalence du VIH parmi les cas d'UB soignés à l'hôpital de district d'Akonolinga était de 14 % ce qui est relativement élevé par rapport à la prévalence de 6 % mesurée par les enquêtes démographie et santé dans la région [64]. De même au Bénin, la prévalence du VIH parmi les cas d'UB de Pobè était de 5 % chez les 15 à 49 ans, alors qu'elle est estimée de 1.1 % pour ce même groupe en population générale [65]. La coinfection VIH et MU se traduit par une sévérité plus importante, comme par exemeple une fréquence accrue de formes disséminées [65,66]. Ces effets sont peut-être à relier avec l'augmentation de l'incidence observée avec l'âge, qui traduirait également une diminution de l'immunité liée au vieillissement.

Quelques facteurs de risque supplémentaires ont été décrits: il semble que la vaccination par le BCG confère une protection transitoire chez les adultes [32,67] et chez les enfants <5 ans [34,62]. Le rôle du niveau socio-économique reste ambigu, de même que celui du niveau d'études [61].

### *1.1.2 Comportements et activités à risque*

La majorité des études cas-témoins réalisées pour identifier les facteurs de risque d'UB prend le parti d'un appariement sur l'âge, le sexe et le village de résidence. L'appariement sur le village d'origine permet de sélectionner des témoins en l'absence d'un recensement complet de la population de la zone d'étude. L'appariement sur l'âge et le sexe est une manière de privilégier la comparaison des activités. Si l'on fait l'hypothèse que les différences de taux d'incidence entre hommes et femmes et/ou entre classes d'âge sont dues à des expositions différentes, il faut faire une comparaison entre des individus malades et non-malades du même sexe et appartenant au même groupe d'âge pour évaluer les expositions à l'origine de l'infection. Si l'on compare les cas et les témoins en général, on constatera que les garçons entre 10 et 15 ans ont un risque accru et les activités de cette classe d'âge seront généralement à risque, mais on ne sera pas capable d'identifier quelles activités spécifiques distinguent les cas des témoins du même âge.

Les résultats obtenus par les études cas-témoins appariées appartiennent, de façon synthétique, à trois grands groupes : les contacts avec l'environnement aquatique, la protection contre d'éventuelles lésions provoquées par divers éléments (insectes, plantes…) et les pratiques relatives à l'hygiène de la peau [61]. On retrouve en général des "facteurs associés" à l'UB provenant de chacun de ces groupes dans la plupart des études cas-témoins. Les comparaisons ne sont pas toujours faciles car la proportion d'individus exposés à tel ou tel facteur est variable, ce qui fait que la puissance pour mettre en évidence des différences n'est pas toujours suffisante; de plus, certaines études ne s'intéressent qu'à certains groupes de facteurs de risque.

Les contacts avec l'environnement aquatique sont en général liés à la fréquentation de milieux de type stagnants [68], impliquant des activités comme marcher dans l'eau [58,59] ou puiser de l'eau [60]. La fréquence des contacts avec les environnements stagnants accroissait en général le risque [60,68], tandis que la fréquentation d'environnements d'eau courante le diminuait au Bénin [60], mais pas au Ghana [69]. La proximité de l'habitation ou du champ avec ces environnements aquatiques était également un facteur de risque important [12,58], qui est cependant difficile à dissocier de leur utilisation. Dans l'étude réalisée au Cameroun, en analyse univariée, les activités en contact avec l'environnement aquatique était associée à un risque accru d'UB lorsqu'elles étaient pratiquées dans les eaux ou les marécages du fleuve Nyong, mais pas dans une autre rivière [58].

La protection de la peau contre les agressions fait intervenir plusieurs comportements, pour lesquels il est parfois impossible de faire la distinction entre les différents types d'agressions contre lesquelles les individus se protègent : blessures accidentelles par des épines, plantes, outils, piqûres d'insectes…

Le port de vêtements courts au champ était un facteur de risque, par comparaison avec les personnes portant des vêtements longs ou n'effectuant pas de travaux champêtres au Cameroun [58]. Le même type d'observations a été fait au Ghana [59], en Australie [70], en Côte d'Ivoire [12]. Plusieurs études ont identifié un rôle protecteur pour des comportements dirigés spécifiquement contre les insectes, comme dormir sous une moustiquaire [58] ou utiliser du répulsif en extérieur [70]. Le fait de partager l'intérieur de l'habitation avec des animaux domestiques était protecteur au Ghana, et pourrait correspondre à une protection indirecte contre l'exposition aux piqûres de moustiques [59]. Cependant certains comportements avaient aussi un risque accru, comme l'utilisation de spirales anti-moustiques au Cameroun [58]. Des d'hypothèses ont été faites à partir de l'étude de la localisation différentielle des lésions chez les cas, selon leur âge et leur sexe. Les lésions sont situées principalement sur les extrémités distales des membres, en particulier inférieurs. Les atteintes du tronc et de la tête sont plus rares et concernent davantage les enfants plus jeunes [57,71]. L'interprétation habituellement proposée est que cette distribution correspond aux types de vêtements portés par les différents groupes d'âges, et renvoie donc aux comportements de protection.

Enfin les habitudes protectrices liées à l'hygiène regroupant l'utilisation de savon pour la toilette [59,60], ou les habitudes de soins des blessures, comme l'utilisation d'alcool ou de feuilles étaient protectrices au Cameroun [58], ou de savon et de poudres antibiotiques au Bénin [60], ainsi que le fait de laver ses vêtements [12].

Les différentes études ne dégagent donc pas un consensus franc sur les facteurs de risques, et ne permettent pas de privilégier l'une ou l'autre des deux principales hypothèses concernant la transmission de MU à l'humain : inoculation par la piqûre d'un vecteur ou une lésion par un objet contaminé, ou introduction à travers une lésion préexistante mise en contact avec un environnement contaminé. Cependant, l'identification de la moustiquaire comme facteur protecteur nous a paru une hypothèse nouvelle et intéressante, qui a justifié la réalisation de l'enquête cas-témoin de réplication faite à Bankim. Cette étude avait pour objectif de confirmer le rôle protecteur de l'utilisation de la moustiquaire, et est présentée au chapitre 2 de ce manuscrit. Les résultats obtenus ont alors renforcé notre hypothèse d'une possible présence de MU dans l'environnement domestique. Les travaux d'entomologie présentés au chapitre 4 et introduits dans la deuxième partie de ce chapitre ont été effectué pour vérifier cette hypothèse.

A noter qu'une direction de travail empruntée sans succès au cours de cette thèse était d'améliorer la caractérisation de l'exposition à MU des individus vivant en zone endémique, afin d'aller au-delà des études cas-témoins classiques. Cette partie n'a malheureusement pas produit de résultats intéressants et ne sera commentée que dans la discussion générale de ce travail.

## 1.2 Distribution spatiale et temporelle des cas d'ulcère de Buruli

L'UB est une maladie étroitement liée à l'environnement, comme l'indiquent sa répartition focale et l'absence de transmission interhumaine [5]. Cependant, les paramètres environnementaux qui favorisent la survenue de cas d'UB restent flous. L'environnement des zones endémiques est mal caractérisé à l'échelle locale. Les variations temporelles dans l'incidence de l'UB n'ont le plus souvent été décrites que de façon sommaire, et rarement analysées.

Un certain nombre de travaux épidémiologiques de grande qualité ont été réalisés en Ouganda dans les années 70, basés sur des cohortes dont le suivi était particulièrement précis [5,72]. Les études réalisées depuis les années 90 en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale sont beaucoup moins orientées vers l'épidémiologie, et souffrent souvent de la faible qualité des données disponibles sur les cas et sur les populations dont elles sont issues, ainsi que des difficultés à surmonter pour mettre en place un suivi prospectif des populations. Quant aux études réalisées dans les foyers d'UB en dehors d'Afrique, comme l'Australie et la Guyane, elles manquent souvent d'un nombre suffisant de cas pour assurer la fiabilité de certaines analyses. De plus, il est difficile de généraliser aux régions endémiques africaines les résultats obtenus dans un contexte très différent, comme le foyer d'UB australien proche de Melbourne.

### *1.2.1 Ouganda : 1965-75*

Plusieurs travaux épidémiologiques de grande ampleur ont été réalisés en Ouganda. Le premier concerne le camp de réfugiés de Kinyara, où une population d'environ 2500 personnes nouvellement exposées à une zone d'UB endémique a été suivie de 1965 à 1970 [5], y compris au cours d'un essai de vaccination par le BCG [32]. Un deuxième s'intéresse à un camp d'employés du programme de contrôle de la trypanosomiase, qui comptait 170 familles et où 45 cas ont été recensés en trois ans et demi (Figure 1.2) [72]. Les autres travaux consistent en la caractérisation de foyers d'UB dans différents districts [73,74]. Enfin, un travail transversal sur la répartition des cas à l'échelle du pays entier pour l'année 1970 a été réalisé [75].

Ces travaux indiquent une répartition extrêmement focale de la maladie à toutes les échelles : pays [75], région [73,74] et « village » [5,72]. Au niveau national, l'incidence était la plus forte le long du Nil entre le lac Kyoga et le lac Albert, et l'incidence diminuait avec l'augmentation de la distance au fleuve [75]. Localement, la distance au cours d'eau principal, le Nil, était également un facteur déterminant [5,72,74]. Cependant, lorsque des informations sur les comportements des populations étaient disponibles, le contact avec le fleuve ne semblait pas nécessaire [5,72], mais la présence et la fréquentation de marécages, permanents ou temporaires, semblaient liées à une incidence supérieure (Figure 1.2) [72,75].

A

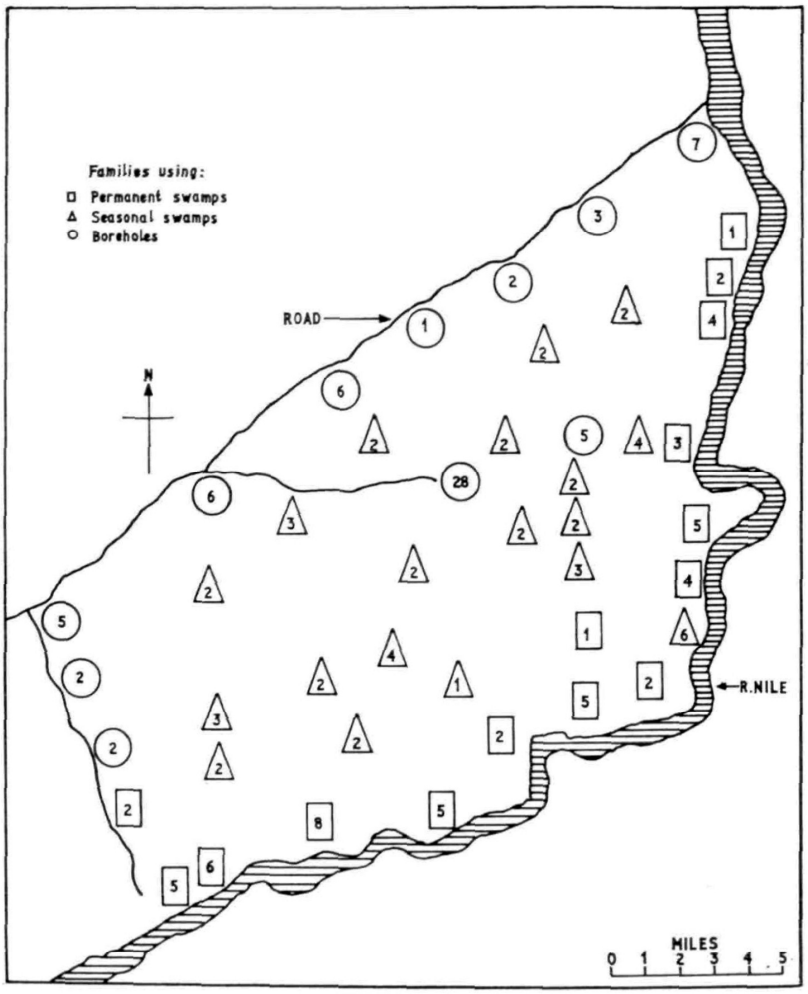



FIG. 1
Location of camps of tsetse control workers.
The figures are the numbers of families living in each camp.

B

TABLE III
*Month of onset of lesions according to source of domestic water*

| Source of water | J | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D | Totals |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Permanent swamps | 6 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 | 4 | 1 | 5 | 0 | 0 | 23 |
| Seasonal swamps | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 1 | 9 |
| Boreholes | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| Totals | 6 | 2 | 3 | 3 | 0 | 1 | 2 | 8 | 3 | 7 | 0 | 1 | 36* |

* Data on month of onset not obtained from 9 of the 45 patients.

**Figure 1.2: Micro-épidémiologie spatiale et temporelle de l'UB en Ouganda, 1970.**
A: Cartographie locale des foyers d'habitation du camp d'employés du programme de contrôle de la trypanosomiase ; B: mois de survenue des lésions en fonction de la source d'eau employée [72].

Des variations temporelles de l'incidence de l'UB ont également été observées. Les différents travaux s'accordent pour conclure à l'existence de variations saisonnières de l'incidence de l'UB. L'incidence était la plus faible durant les mois d'avril à juin [72,76], voire de mars à août [5,76]. Cependant, le risque d'UB semblait varier avec le type d'environnement. Les familles qui utilisaient des marécages permanents comme source d'eau présentaient une incidence élevée répartie sur toute l'année, alors que les familles ayant recours à des marécages temporaires présentaient une incidence plus faible et saisonnière, et les familles utilisant des puits ne présentaient que quelques cas sporadiques [72]. L'utilisation d'une source d'eau est liée à sa proximité, ces résultats nous renseignent donc davantage sur les environnements à risque et la saisonnalité du risque que sur un éventuel mode de transmission.

A l'inverse, des différences liées au genre ont été observées, avec des variations saisonnières plus marquées chez les hommes que chez les femmes. Les auteurs expliquaient cette différence par une exposition aux environnements à risque limitée à la saison des cultures chez les hommes, alors que les femmes fréquentaient également les marécages permanents pour les tâches domestiques, et étaient donc exposées de façon continue [76]. De telles différences ne s'observaient pas chez les réfugiés rwandais de Kinyara, qui n'avaient pas les mêmes coutumes de division des tâches [5,76]. Ces éléments viennent s'ajouter à la distribution asymétrique des âges des cas en fonction du sexe pour conforter l'hypothèse selon laquelle le risque d'infection par MU serait différent en fonction des activités.

### ***1.2.2 Etudes spatiales récentes***

Depuis cette période, plusieurs cartes de prévalence ou de taux de prévalence d'UB ont été établies à l'échelle nationale au Bénin [77], en Côte d'Ivoire [78], au Ghana [37], ou à l'échelle d'une région endémique, comme au Cameroun dans la vallée du Nyong [47,79] (Figure 1.3), ou plus récemment en République Démocratique du Congo [46]. On constate que l'UB se localise principalement autour des grands fleuves à débit lent (Ouèmé et Zou au Bénin, Nyong au Cameroun…) mais pas autour du Lac Volta par exemple [15,37]. Beaucoup de ces travaux se limitent à la cartographie des cas sans chercher à identifier les facteurs associés à la présence de la maladie.

Trois études ont cependant cherché à comprendre la distribution spatiale de la maladie et les environnements associés à une prévalence élevée [78,80,81]. La première recherchait des associations à l'échelle du village entre forte incidence et variables décrivant l'environnement (catégories d'occupation du sol, topographie) sur la base des cas enregistrés au Bénin en 2004 et 2005 [80]. La deuxième est un travail similaire effectué en Côte d'Ivoire, sur la base des cas d'UB enregistrés en 1997, où l'analyse de l'occupation du sol était complétée par l'utilisation

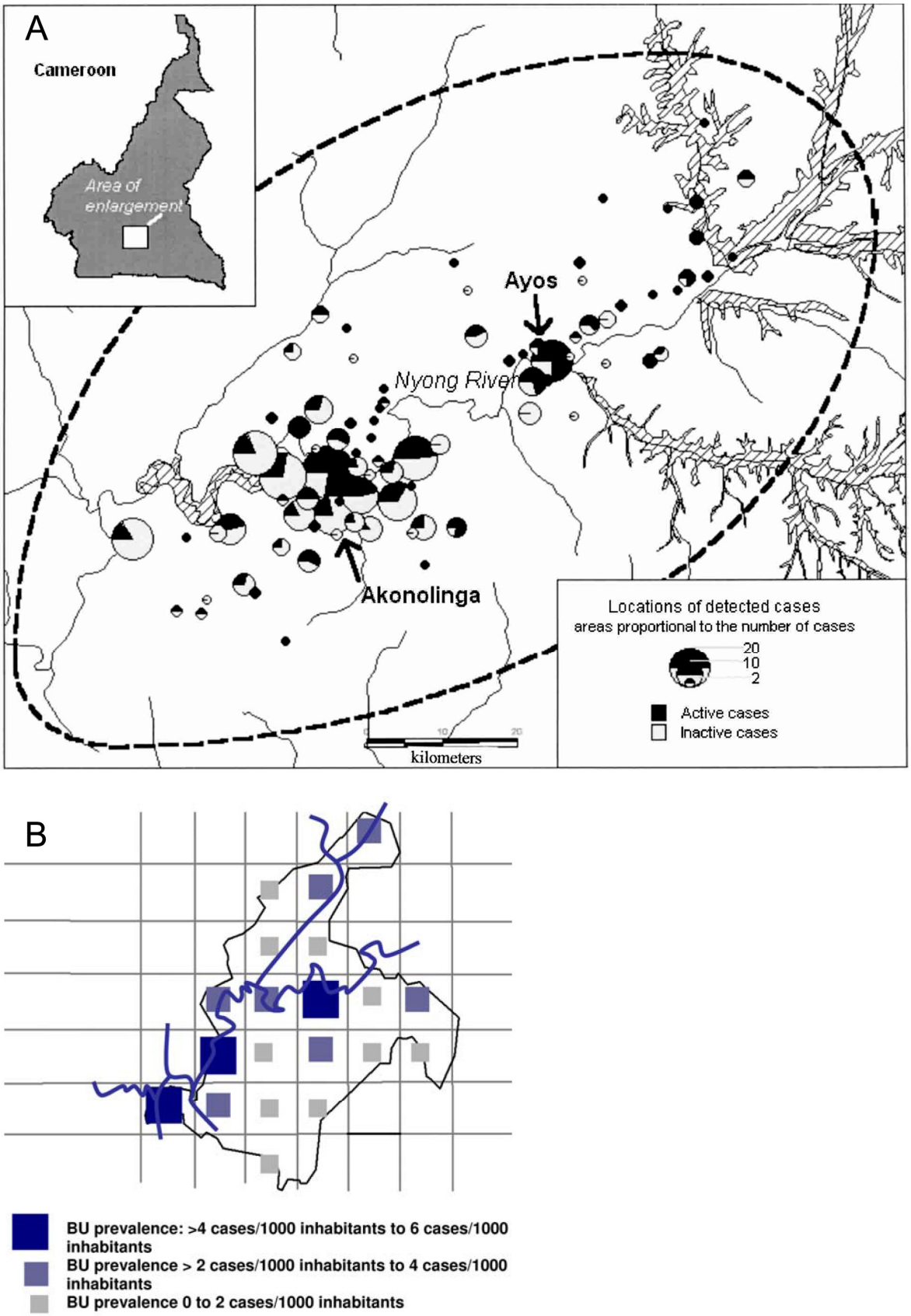



**Figure 1.3: Deux cartes de prévalence de l'UB dans le district d'Akonolinga au Cameroun.**
A: Prévalence en 2001 [79], B: Taux de prévalence de lésions actives en 2006 [47].

du tonnage de riz ou de bananes produits par unité spatiale, afin d'approximer la surface de terres agricoles irriguées [78]. Une troisième étude a été conduite en Australie à partir des cas survenus dans le sud de l'Australie (Melbourne et région côtière) entre 1981 et 2008 [81]. Cette dernière étude incluait également des variables temporelles climatiques (pluviométrie, température).
Enfin, quelques études se sont intéressées à l'effet d'une seule variable environnementale, comme l'altitude au Bénin [82] ou la présence d'arsenic dans le sol au Ghana [83].

Les principaux résultats sont l'association entre forte incidence d'UB et faible altitude [80–82] et forte proportion de couvert forestier [78,80,81]. En termes d'occupation du sol, en Côte d'Ivoire, une surface importante d'agriculture irriguée (traduite par une production importante de riz) était un facteur de risque [78], et au Bénin, une forte proportion de terrains agricoles dans un rayon de 20km était également un facteur de risque [80,84]. La présence de zones urbanisées dans un rayon de 50km était associée à une diminution du risque au Bénin, ce que les auteurs interprétaient comme résultant d'une plus grande disponibilité des forages à pompe dans ces zones [80,84]. Du point de vue de la topographie, le modèle établi au Bénin désignait les zones présentant une topographie contrastée (indiquée par un fort écart-type de l'indice d'humidité) comme à risque augmenté [80]. Sur le plan des écosystèmes, la Côte d'Ivoire montrait une incidence plus forte dans la partie centrale du pays, à la transition entre forêt et savane [78], alors qu'au Bénin, l'UB était associé aux faibles latitudes et diminuait selon un gradient Sud-Nord [84].
L'apport des variables climatiques dans le modèle australien reste difficile à évaluer car les résultats obtenus sont difficilement interprétables. Une température minimale élevée et une forte pluviométrie totale étaient associées à une augmentation du risque d'UB 18 (respectivement 19) mois après, mais une faible pluviométrie était associée à une augmentation du risque 5 mois plus tard [81].

Pour ces différents travaux, la prévalence d'ulcère de Buruli était obtenue à partir des données de surveillance, et calculée à un niveau d'agrégation supérieur à celui du village d'habitation. En Côte d'Ivoire, il s'agissait de 202 hôpitaux ou centres de santé primaires [78]. En milieu rural, un centre de santé dessert plusieurs villages dans un rayon de 10 à 15km [78]. Au Bénin, le travail a été réalisé sur 327 « villages » [80]. Ces « villages » sont en fait très probablement les chefs-lieux d'arrondissement : lors de travaux sur les deux départements du Ouèmé et du Plateau au Bénin, nous avons travaillé sur plus de 400 localités, elle-même subdivisées en hameaux, et entre 4 et 10 localités étaient regroupées pour former un arrondissement.
Même un faible niveau d'agrégation spatiale comme celui de ces études risque déjà probablement de masquer une partie de l'hétérogénéité locale : en Ouganda, des différences d'incidence étaient

observables sur quelques kilomètres de distance par rapport au Nil [5,72]. En Côte d'Ivoire, l'incidence décroissait avec l'augmentation de la distance aux lacs de barrage sur environ 5km [78].

Les caractéristiques de l'environnement ont également été mesurées sur des zones larges : au Bénin et en Australie, un rayon de 20km autour du centre d'agrégation [80,81] et en Côte d'Ivoire, un carré de 10km de côté [78]. De plus, la précision des cartographies d'occupation du sol était relativement faible : en Australie et au Bénin, 5 classes (forêt, agriculture, urbain, eau et marécage), complétées par des variables topographiques (altitude, indice d'humidité) [80,81]; en Côte d'Ivoire, 2 classes (forêt ou eau), complétées par le tonnage de riz irrigué et celui de bananes produits dans la zone [78]. Là encore, les hétérogénéités à petite échelle susceptibles d'expliquer un excès localisé de cas risquent d'être masquées, qu'il s'agisse d'environnements particuliers ayant une surface trop petite pour être détectée, ou de variations d'un même environnement (par exemple, type de cultures ou de forêts) qui ne sont pas appréhendées par une carte d'occupation du sol qui manque de précision (résolution spatiale ou distinction entre catégories voisines).

Ces travaux permettent de caractériser les régions à risque à l'échelle d'un pays. Ils confirment dans les grandes lignes, les éléments classiquement associés à l'UB comme le milieu rural, ou à son émergence, comme le développement de l'agriculture irriguée. Cependant, ils ne donnent que très peu d'éléments pour essayer de comprendre où et comment se passe la transmission de MU à l'être humain, et où devraient se concentrer les activités de prévention, de recherche de cas... Des analyses à une échelle plus locale nécessitent le recueil précis du village d'habitation des cas, de sa localisation géographique et de sa population afin de pouvoir calculer un taux de prévalence ou d'incidence.

Quelques études ont également cherché à identifier s'il existait une association entre détection de MU dans l'environnement aquatique et taux de prévalence de l'ulcère de Buruli, mais en présence de résultats contradictoires [85,86], il semble difficile de trancher. La question de la qualité des données épidémiologiques s'ajoute ici à celle de la qualité de l'échantillonnage environnemental, dans un contexte où l'on ignore la localisation précise et les fluctuations de MU dans l'environnement aquatique (chapitre 1, partie 2). Enfin, les progrès récents réalisés dans le génotypage des isolats de patients ont permis de cartographier la répartition spatiale des souches identifiées dans une région du Ghana [87]. Les résultats dont on dispose jusqu'à présent restent limités, et on n'a pas encore été capable de génotyper les MU détectés par PCR dans les prélèvements environnementaux (chapitre 1, partie 2), afin de relier les souches de MU infectant les humains, les souches de MU circulant dans l'environnement, et les environnements où elles circulent.

### *1.2.3 Etudes temporelles récentes*

L'étude des variations temporelles de l'incidence de l'ulcère de Buruli se heurte à plusieurs problèmes d'ordres pratique et méthodologique, qui expliquent que la plupart des auteurs se limitent à de simples observations sur les nombres de cas mensuels.

Au niveau pratique, la démonstration de variations saisonnières de l'incidence de l'UB nécessite une série de données suffisamment longue pour pouvoir mettre en évidence des phénomènes de périodicité annuelle. Cette série doit de plus compter suffisamment de cas, en provenance d'un bassin de population défini. Dans l'idéal, l'analyse devrait se faire à partir de la date d'apparition des lésions, qui est rarement connue de façon précise. A défaut, il est possible de travailler sur la date de diagnostic à condition que le délai entre apparition des lésions et consultation reste raisonnable.

Ainsi, le niveau de qualité de données requis pour de telles analyses n'est atteint que dans des centres de traitement implantés de longue date, avec une bonne continuité dans l'infrastructure, la prise en charge et l'enregistrement des données. C'est le cas pour les foyers d'UB d'Australie ou de Guyane Française, situés dans des régions faiblement endémiques mais bénéficiant d'un système de santé de pays développés. En Afrique sub-saharienne, les données sont recueillies au niveau d'hôpitaux ou de centres de traitement spécialisés.

L'analyse temporelle de l'incidence de l'UB présente également des contraintes méthodologiques. Même dans les zones les plus endémiques, les nombres de cas enregistrés sont faibles, quelques cas à quelques dizaines de cas par mois maximum avec de fortes variations d'un mois sur l'autre ou d'une année sur l'autre, auxquelles s'ajoutent des tendances à plus long terme [12,88]. Ces données sont difficiles à analyser avec les techniques classiques de séries temporelles, mais peuvent être traitées en utilisant des ondelettes [89].

Différentes méthodes ont été combinées récemment pour l'analyse de la série temporelle des cas d'UB enregistrés en Guyane Française, et ont permis de mettre en évidence différentes périodicités dans cette série, dont, entre-autres, une périodicité annuelle, et une périodicité plus longue correspondant à une influence des oscillations climatiques de type "El Niño" [88].

Au final, l'épidémiologie spatiale et temporelle de l'ulcère de Buruli demeure un domaine beaucoup moins documenté que les facteurs de risque, avec deux lacunes principales : l'étude spatiale de la répartition des cas à l'échelle locale ou régionale, et l'analyse des variations temporelles dans les zones endémiques africaines en utilisant des données de qualité suffisante et les techniques appropriées.

## 2. La caractérisation du réservoir environnemental de *M. ulcerans* et l'identification des mécanismes de transmission potentiels

La transmission inter-humaine de l'infection par MU est hautement improbable et l'UB semble associé à des environnements particuliers [5]. Deux questions principales justifient les recherches de MU dans l'environnement :

- la recherche des hôtes de MU dans l'environnement, c'est-à-dire de réservoirs naturels, présentant ou non des symptômes, dans lesquels se maintient ou se multiplie le microbe
- parmi ces hôtes ou en plus, la recherche de potentiels vecteurs de MU, c'est-à-dire, d'organismes impliqués, activement ou passivement, dans l'infection des êtres humains ou d'autres organismes.

### 2.1 Méthodes de détection de *M. ulcerans* à partir des échantillons de l'environnement

Les mycobactéries pathogènes pour l'homme ne représentent qu'une fraction de la diversité des mycobactéries (plus de 140 espèces) qui sont présentes de façon ubiquiste dans l'eau et le sol [90].
La présence de ces mycobactéries empêche l'utilisation, sur les échantillons de l'environnement, de certaines techniques employées pour le diagnostic biologique de l'infection par MU chez les patients. L'identification de BAAR par microscopie après coloration de Ziehl-Nielsen ne permet pas de distinguer MU d'une autre mycobactérie. La culture a été utilisée dans les années 70 sur des échantillons de plantes [91], mais depuis 1990, seuls deux articles rapportent l'obtention de cultures de MU à partir d'échantillons de l'environnement [92,93]. Les contaminations par d'autres mycobactéries à croissance plus rapide sont très fréquentes [94–96].

Les recherches actuelles se basent donc principalement sur la détection de l'ADN de MU par des techniques de biologie moléculaire. Les premiers travaux étaient basés sur la détection par PCR classique sur IS2404 [97], une séquence d'insertion présente en grand nombre de copies chez MU mais également chez *M. marinum*. Le développement de méthodes de PCR quantitative (qPCR), a permis d'une part de détecter des quantités d'ADN 100 à 1000 fois plus faibles que la PCR classique et d'autre part, d'estimer le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon et ainsi de hiérarchiser les échantillons en fonction de l'abondance de MU [98]. La détection d'IS2404 est complétée par la détection d'IS2606, une autre séquence d'insertion, et celle d'ER ou KR, deux gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse de la mycolactone qui assurent la spécificité de la détection (voir encadré 1). La QPCR permet de suivre « en temps réel » l'amplification de l'ADN grâce à l'incorporation par celui-ci d'un traceur fluorescent. On définit ainsi le seuil de cycle, « Ct », comme le nombre de cycle d'amplifications de l'ADN nécessaires pour mesurer une augmentation significative

de la fluorescence. Ce seuil est proportionnel à la quantité de d'ADN (donc de bactéries) présente dans l'échantillon initial.

**Encadré 1: détecte-t-on bien *Mycobacterium ulcerans* ?**

Le choix des cibles amplifiées par PCR ou qPCR dans les échantillons permet de détecter MU grâce à la combinaison de IS2404, séquence d'insertion présente chez MU et *M. marinum*, ainsi que la détection de ER (enoyl-réductase) ou KR (kéto-réductase), deux enzymes intervenant dans la synthèse de la mycolactone et dont les gènes sont portés par un plasmide, pMUM001. L'acquisition de ce plasmide est considérée comme l'événement séparant MU de *M. marinum*. La présence simultanée de ces deux séquences suffit à définir MU: MU est une mycobactérie ayant intégré IS2404 et produisant de la mycolactone [153].

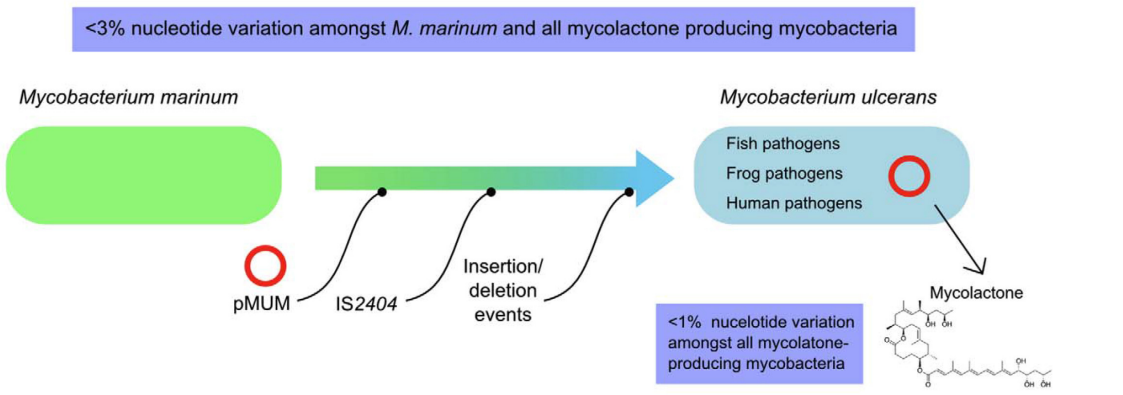



**Figure 1. Overview of the evolution and principal species-defining features of *Mycobacterium ulcerans* as established by multi-locus sequence and genome deletion analysis.**
doi:10.1371/journal.pntd.0000663.g001

La question de la diversité génétique de MU dans l'environnement par rapport à la diversité de MU chez les cas d'UB reste posée. La diversité observé pour l'instant chez les cas est faible : entre 10 et 30 sites de polymorphisme de nucléotides uniques (single nucleotide polymorphism, SNP) pour tous les cas d'une même région du Ghana. Ceci est en accord avec la faible variabilité génétique observée chez les Mycobactéries, en particulier chez *M. tuberculosis*.
Quant à la diversité de MU dans l'environnement, on ne peut que l'entrevoir car les tentatives de cultures à partir de l'environnement sont restées vaines, à l'exception des isolats obtenus chez les Marsupiaux en Australie, identiques aux isolats humains [103], et d'une souche cultivée à partir d'un Hémiptère aquatique [93].

La difficulté de la culture empêche de séquencer le génome entier d'isolats environnementaux de MU, et donc de décrire la diversité de MU dans l'environnement de façon satisfaisante. On peut en effet s'interroger sur l'efficacité des méthodes conventionnelles de génotypage basées sur l'analyse de séquences répétées en nombre variable (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) dont la capacité à décrire précisément la diversité génétique a été remise en question chez *M. tuberculosis* [154]. Des lignées de MU produisant une forme différente de la mycolactone (mycolactone F), ont été identifiées chez des Poissons, des Tortues, y compris dans des zones où l'on n'observe pas de cas d'ulcère de Buruli [153]. La question de leur présence ou de leur participation au fardeau de l'UB en zone endémique reste entière, car les isolats de patients sont

## 2.2 *M. ulcerans*, une bactérie environnementale à la fois ubiquiste et insaisissable ?

On peut tout d'abord mentionner quelques diagnostics d'infection par MU qui ont été confirmés chez divers animaux domestiques vivant en Australie dans un foyer d'UB (Chats, Chiens, Chevaux, Alpacas). S'ils renseignent sur la possibilité pour MU d'infecter des mammifères variés, ces animaux ne représentent que des cas isolés d'infections, peu différents des cas humains sur le plan épidémiologique. Il existe également quelques articles « à propos d'un cas » vétérinaire, où une mycobactérie apparentée à MU a été détectée chez une tortue, et chez des poissons d'espèces diverses.

Nous nous concentrerons ici sur les résultats obtenus après un échantillonnage suffisamment important dans les régions endémiques, ou sur les résultats de comparaisons entre régions endémiques et non endémiques.

La recherche de la localisation de MU dans l'environnement et l'identification d'hôtes et de vecteurs potentiels ont été effectuées dès les premiers travaux sur l'UB en Ouganda. En 1970, des colonies de mycobactéries sont obtenues à partir de prélèvements réalisés sur des plantes de la famille des Poacées en zone endémique d'ulcère de Buruli [91]. Les auteurs en concluent que les individus s'infectent en se coupant sur les feuilles de ces plantes poussant aux abords des marécages. Au vu des difficultés rencontrées aujourd'hui pour l'isolation de MU à partir d'échantillons de l'environnement [94,96], il n'est donc pas sûr que les mycobactéries obtenues aient été MU, même si elles provoquaient des symptômes similaires à l'ulcère de Buruli lorsqu'injectées à des souris. Des études ultérieures montrent que si des bactéries proches de MU peuvent être détectées en grande quantité sur les plantes, la proportion de MU est en fait faible : 50 % positifs à IS2404 mais 3 % positifs à IS2404+ER [86].

Depuis 1999 et la généralisation de la PCR, la présence de MU a pu être recherchée de manière systématique dans de nombreux environnements et chez de nombreux organismes, sans a priori de symptômes.

### *2.2.1 Détection de* M. ulcerans *dans l'environnement aquatique*

L'ADN de MU a été détecté dans l'eau et les sédiments de points d'eau situés dans les foyers d'ulcère de Buruli [43,85,86,94,96,99–104].

La proportion d'échantillons positifs s'avère très variable d'une étude à l'autre, d'un type de prélèvement à l'autre (Tableau 1.1). Il est difficile d'analyser les causes de ces variations car peu d'études sont comparables. La caractérisation des environnements à risque peut être plus ou moins précise, les méthodes de détection ont gagné en sensibilité et en spécificité avec l'arrivée de la qPCR et la recherche de séquences autres que IS2404. D'autre part, les stratégies et les périodes

d'échantillonnage diffèrent d'une étude à l'autre, et il n'existe pas d'étude longitudinale sur la détection de MU dans l'eau et les sédiments permettant d'évaluer si les variations saisonnières de colonisation par MU observées dans la faune aquatique se retrouvent également dans ce compartiment.

Le second élément est la faible quantité de bactéries détectées dans l'eau et le sol pour les études réalisées en qPCR. Lorsqu'ils sont rapportés, on constate que la plupart des Ct sont supérieurs à 35 [86,96], ce qui indique des concentrations extrêmement faibles d'ADN. Certains auteurs ne considèrent d'ailleurs positifs que les échantillons dont le Ct est inférieur à 35 [43,105].

Les zones définies comme « non endémiques », où la maladie est absente, présentent généralement peu ou pas d'échantillons positifs [86,103], mais la définition des zones non-endémiques est parfois imprécise, surtout en l'absence d'enregistrement systématique des cas sur une période longue [85,86].

**Tableau 1.1 : Synthèse des résultats de détection de MU dans l'environnement aquatique.**

| Référence, année, pays | Méthode | Eau/ filtrat | Sédi-ments | Sol | Débris | Biofilms | Plantes aqua-tiques |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Morris, 2014, Guyane** [43] | qPCR IS2404+KR (Ct<35) | 5/130 (4%) | | | | | |
| **Bratschi, 2014, Cameroun** [96] | qPCR IS2404 +IS2606+KR | 3/109 (3%) | | 2/108 (2%) | | | 0/109 (0%) |
| **McIntosh, 2014, Ghana** [104] | PCR ER +VNTR | | | | | | 92/236 (39%) |
| **Williamson, 2012, Bénin** [86] | qPCR IS2404+ER | 30/130 (23%) | | 3/46 (7%) | | 3/19 (16%) | 2/69 (3%) |
| **Fyfe, 2010, Australie** [103] | qPCR IS2404 +IS2606+KR | 4/4 (100%) | 9/27 (33%) | 22/36 (61%) | 3/14 (22%) | 2/10 (20%) | 1/9 (11%) |
| **Vandelannoote, 2010, Ghana** [102] | qPCR IS2404 +IS2606+KR | 1/13 (8%) | | | 0/45 (0%) | 0/90 (0%) | |
| **Williamson, 2008, Ghana** [85] | PCR ER | 97/260 (37%) | | 3/100 (3%) | | | |
| **Stinear, 2000, Australie** [101] | PCR IS2404 | 2/35 (6%) | 0/6 (0%) | | 2/14 (14%) | | 1/2 (50%) |
| **Portaels, 1999, Bénin** [106] | PCR IS2404 | | | | | | 0/30 (0%) |

L'environnement aquatique « en général » reflète donc la présence de MU mais au vu des résultats, il est difficile de se faire une idée de la localisation exacte de la bactérie au sein de cet environnement, pas plus que de sa persistance. Une seule étude rapporte un suivi longitudinal de la présence de MU dans un point d'eau domestique, fréquenté par des riverains, parmi lesquels plusieurs cas d'UB [96].

Les niveaux de MU détectés sont extrêmement faibles (tous les Ct>35 sauf 1), à la limite de l'interprétation. Le nombre de prélèvements positifs pour MU semble décroitre avec le temps sur une durée de 24 mois. Les cas d'UB fréquentant le point d'eau ont été pris en charge, et il n'y a pas eu d'autre cas d'UB dans le village au cours du suivi. Il n'est au final pas possible de conclure si le point d'eau était une zone à risque ou bien s'il avait été contaminé par les cas qui l'utilisent.

### ***2.2.2 Détection de* M. ulcerans *au sein de la faune des régions endémiques***

D'autres études se sont concentrées sur la détection de MU dans la faune, après la découverte fortuite d'Hémiptères positifs pour MU en PCR [106]. Ces études ont permis de mettre en évidence une abondante diversité de taxons aquatiques positifs, arthropodes, vertébrés, gastéropodes… ainsi que, en Australie, deux groupes d'animaux terrestres, des moustiques et des marsupiaux (Tableau 1.2).

Deux études ont collecté la faune aquatique de façon large en échantillonnant de nombreux points d'eau à l'aide de filets, et en triant et identifiant la totalité des organismes recueillis. La présence de MU a ensuite été recherchée par PCR dans un sous-ensemble des échantillons collectés. La force de ces études est de présenter l'abondance relative des différents organismes et la proportion d'organismes positifs dans chaque groupe, ce qui permet des comparaisons.

L'étude la plus ancienne a été réalisée au Ghana en saison pluvieuse, sur 27 points d'eau [107]. Nous ne distinguerons pas les résultats entre les points d'eau endémiques et non endémiques car cette caractérisation a récemment été remise en cause par les auteurs eux-mêmes, qui ont indiqué que leurs données sur les cas humains n'étaient vraisemblablement pas de qualité suffisante [86].

L'étude la plus récente a été réalisée sur 16 points d'eau dans chacune des deux régions endémiques du Cameroun, Akonolinga et Bankim [105]. Les échantillonnages ont été réalisés chaque mois dans la région d'Akonolinga et chaque trimestre dans celle de Bankim, et permettent également d'analyser les variations de la présence de MU au cours du temps.

**Tableau 1.2 : synthèse des résultats de détection de MU dans la faune des régions endémiques.**

| Auteur, Année, Pays [référence] | Méthode | Vertébrés | Gastéro-podes | Hémiptères | Odonates | Ephémé-roptères | Coléo-ptères | Diptères | Lépido-ptères |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Benbow, 2008 Ghana** [107] | PCR ER Pools | 4/31 (13%) (anoures) | 4/77 (5%) | 14/192 (7%) | 8/109 (7%) | 5/84 (6%) | 14/186 (8%) | 9/158 (6%) Culicidae 2/30 (7%) Chironomidae 4/57 (7%) | 2/3 (67%) |
| **Garchitorena, 2014 Cameroun** [105] | qPCR KR +IS2404 Pools | 11/123 (9%) (poissons) 10/149 (7%) (anoures) | 5/150 (3%) | 45/396 (11%) | 34/362 (9%) | 26/357 (7%) | 30/513 (6%) | 39/413 (9%) | 6/44 (14%) |
| **Wilson, 2013 Ghana** [108] | PCR ER+VNTR Individus | 25/65 (38%) (poissons) 96/162 (60%) (têtards) 7/11 (63%) (anoures adultes) | | | | | | | |
| **Marion, 2011 Cameroun** [109] | qPCR KR +IS2404 Pools | | | 12/244 (5%) 14/99 (14%) (salive) | | | | | |
| **Marion, 2011 Bénin** [110] | qPCR KR +IS2404 Individus | | | aquatiques 10% (n=347) 3/35(9%) capturés dans l'air | | | | | |
| **Doannio, 2011 Côte d'Ivoire** [111] | PCR IS2404 Pools | | | 3/35 (9%) 1/35 (3%)(salives) | | | | | |
| **Marion, 2010 Cameroun** [112] | qPCR KR +IS2404 Pools | | | 68/616 51/293 (salives) | | | | | |
| **Kotlowski, 2004 Bénin** [113] | PCR IS2404 Individus | 3/15 (20%) (poissons) | 1/6 (17%) | 11/56 (20%) | | | | | |
| **Durnez, 2010 Bénin** [114] | PCR IS2404 Individus | 0/565 (0%) (rongeurs + musaraignes) | | | | | | | |
| **Johnson, 2007 (Lavender, 2011) Australie** [115,116] | qPCR IS2404 +IS2606+KR Pools | | | | | | | 16/957 (2%) Culicidae (adultes) | |
| **Fyfen, 2010 Australie** [103] | qPCR IS2404 +IS2606+KR Individus | 24/191(13%) (oposums) 127/497 (26%) (fécès) | | | | | | | |
| **Carson, 2014 Australie** [117] | qPCR IS2404 +IS2606+KR Individus | 24/222 (11%) (fécès) | | | | | | | |

Ces deux études concordent pour indiquer qu'une grande diversité d'organismes aquatiques est positive pour MU en PCR : beaucoup d'arthropodes, mais aussi des vertébrés (poissons, anoures…), des annélides... Parmi ces organismes, il est difficile d'identifier la contribution plus particulière de certains. L'étude longitudinale réalisée à Akonolinga démontre l'existence de variations spatiales et temporelles dans la présence de MU. La proportion d'échantillons positifs pour MU variait au cours du temps et présentait un maximum durant le début de la grande saison pluvieuse (Août). Des variations selon les espèces étaient également observées, et selon le type de point d'eau. Si la faune aquatique des marécages semblait présenter des taux d'organismes positifs stables au cours du temps, les cours d'eau et les zones inondables présentaient des pics de positivité très marqués, probablement dus aux changements saisonniers drastiques qu'ils subissent (Figure 1.4).

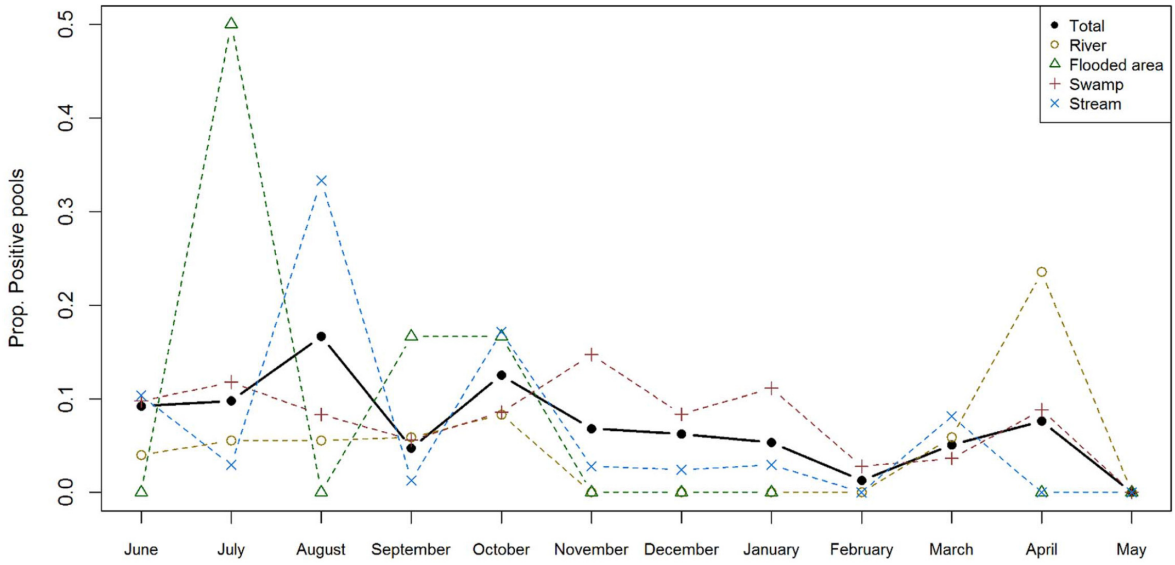



**Figure 3. Monthly distribution of *M. ulcerans* positivity rate in sample-pools from aquatic ecosystems in Akonolinga from June 2012 to May 2013.** Values indicate the proportion of pools of aquatic organisms collected from a specific ecosystem that were positive to *M.ulcerans* at a given month. The solid line in black represents the total trend (all ecosystems); dashed lines represent trends for pools from each type of ecosystem. Missing information for flooded areas in February and March is due to lack of water in those sites, which prevented sampling.
doi:10.1371/journal.pntd.0002879.g003

**Figure 1.4 : Variations temporelles de la présence de MU dans les échantillons de faune aquatique par type de milieu, à Akonolinga, Cameroun** [105].

Les études ponctuelles consacrées à l'un ou l'autre groupe d'organismes aquatiques permettent de confirmer le rôle possible de ces groupes, lorsque l'échantillonnage est suffisant (Tableau 1.2). Ainsi, les Hémiptères ont été identifiés porteurs de MU lors de captures réalisées dans quatre des principaux pays endémiques africains : Bénin, Ghana, Côte d'Ivoire, Cameroun (Tableau 1.2). La détection d'ADN de MU dans leur salive est un argument important en faveur de la capacité de ces insectes à pouvoir transmettre MU à d'autres animaux ou aux humains. L'augmentation du nombre

de bactéries détectées par qPCR quatre mois après injection de salive à des souris indique que les MU détectés étaient probablement viables.

Enfin, le foyer d'UB de la région de Melbourne, en Australie, donne un aperçu très différent de la répartition de MU. La bactérie a été détectée dans des moustiques, principalement du genre Aedes [115] et la proportion de moustiques positifs détectés dans les différentes communes croît avec le taux d'incidence d'UB dans la population [116]. MU a ensuite été identifiée chez des opossums, marsupiaux endémiques, chez qui elle cause des lésions cutanées de type UB, de façon relativement fréquente [103]. Elle semble aussi capable d'une colonisation du tube digestif, associée ou non à la présence de lésions et la bactérie est détectée dans les fécès des opossums [118]. Il n'existe par contre pas de données récentes sur d'autres taxons de la faune aquatique ou terrestre.

De même que pour les analyses réalisées sur l'eau et les sédiments, les analyses de la présence de MU dans la faune aquatique donnent l'impression d'une bactérie ubiquiste, pour laquelle il est difficile d'identifier des hôtes spécifiques. Il semble qu'on puisse suivre la présence du pathogène au fil de la chaîne alimentaire dans l'environnement aquatique : d'abord sur des plantes ou en biofilm, puis chez des organismes herbivores (têtards, gastéropodes), puis chez des prédateurs (Hémiptères, Odonates), et certaines de leurs proies (poissons…). Certains organismes vérifient plusieurs critères pour être considérés comme des vecteurs, en particulier les Hémiptères, mais aucun n'émerge comme le seul hôte de MU. Du point de vue de l'environnement terrestre, l'échantillonnage s'est limité à quelques groupes, ce qui empêche de se faire une vision d'ensemble.

### ***2.2.3 D'autres approches autour de la transmission***

#### 2.2.3.1 Vérifications expérimentales des hypothèses de transmission et de milieu de vie de *M. ulcerans*

La colonisation et l'infection de certains de ces groupes ont été étudiées plus en détail au laboratoire. Les Hémiptères aquatiques ont été étudiés en détail et les travaux réalisés ont permis de montrer la possibilité pour certains groupes de s'infecter lors d'un repas sur une proie contaminée [92,119,120], et de transmettre l'infection à la souris lors d'une piqûre 30 jours post-repas infectant [92]. L'analyse par microscopie optique et à balayage a permis de montrer que la bactérie se localisait et se multipliait au niveau des glandes salivaires [92] après passage dans la cavité cœlomique via la capsule céphalique [121].

L'exposition des souris à des piqûres de Bélostomes non-infectés a démontré un effet protecteur contre une piqûre ultérieure par un Bélostome infecté. Cette observation est concordante avec le fait

qu'un échantillon de pêcheurs béninois sans symptôme d'UB malgré une exposition forte à des environnements aquatiques à risque, présentait un niveau moyen d'anticorps anti-salive de punaises supérieur à celui d'un groupe de cas d'UB [122].

Enfin, la possibilité d'une entrée de MU par des lésions préexistantes a également été testée au laboratoire, sans résultats positifs jusqu'à présent. Aucun cobaye dont la peau avait été abrasée puis mise en contact avec des solutions contenant MU n'a présenté d'infection alors que les cobayes ayant subi une injection étaient infectés [123]. De même, des souris dont on avait entaillé la queue n'ont pas été infectées lorsque leur queue était trempée dans une solution de MU (Marsollier L, communication personnelle). On peut noter que beaucoup de mycobactéries responsables de pathologies cutanées nécessitent une inoculation pour provoquer une infection [124].

Le rôle des plantes aquatiques a également été étudié. La croissance des isolats de MU s'avère favorisée en présence d'extrait d'algues : le temps de doublement en culture était de 3 jours avec extrait d'algues contre 5 jours sans, [94]. Les éléments actifs dans ces extraits d'algues seraient des polysaccharides (maltotriose, maltopentose). La disponibilité en polysaccharides influencerait également la production de mycolactone et la production de sidérophores [125]. L'étude du fonctionnement de MU en interaction avec ses différents hôtes (démontrés ou potentiels) indique que MU est capable de survivre dans différentes niches et d'adapter son métabolisme aux différents hôtes, ce qui tendrait à confirmer le caractère ubiquitaire déduit des résultats de détection dans l'environnement.

#### 2.2.3.2 Arguments épidémiologiques

Quelques résultats issus des études épidémiologiques donnent des indications sur de possibles voies de transmission de MU, mais les résultats obtenus ne permettent pas de trancher entre les deux principales hypothèses de transmission : existence d'un vecteur ou infection par l'exposition de lésions préexistantes à un environnement contaminé.

Des facteurs de risques associés à l'exposition aux piqûres de moustiques ont été décrits en Australie et l'utilisation d'une moustiquaire a été identifiée comme un facteur protecteur au Cameroun.

En Australie, l'incidence cumulative d'UB entre 2005 et 2009 était corrélée à la prévalence de MU parmi les moustiques capturés au cours de la même période [116]. Cependant, les facteurs protecteurs liés à l'hygiène de la peau et en cas de blessure (utilisation de savon, désinfections…) se retrouvent également dans la plupart des études (chapitre 1, partie 1.1.2). De même, une épidémie d'UB survenue au voisinage d'un terrain de golf en Australie avait été attribuée à une transmission

par des aérosols contaminés, mais cette hypothèse n'a pas été confirmée ni émise à nouveau dans d'autres contextes [126].

2.2.3.3 Arguments génomiques : *M. ulcerans*, une mycobactérie adaptée à un (des) hôte(s) ?

L'analyse du génome de MU et la comparaison avec celui de son groupe-frère *M. marinum* révèlent chez MU l'acquisition du plasmide permettant la production de myclactone et la perte d'un nombre important de gènes ou leur transformation en pseudo-gènes (Encadré 1). La plupart des auteurs s'accorde à considérer cette simplification du génome comme un marqueur de l'adaptation à un nouvel environnement [127]. En particulier, la perte de plusieurs gènes correspondant à des protéines hautement immunogènes chez *M. marinum* suggère que ces changements ont été sélectionnés parce qu'ils permettaient à MU d'échapper au système immunitaire d'un hôte [127,128]. Un tel processus a par exemple été décrit pour *M. leprae* ou *Yersinia pestis*. L'acquisition préalable du plasmide permettant la synthèse de la mycolactone, une toxine immunosuppressive vient conforter cette hypothèse.

D'autres changements génomiques et phénotypiques peuvent renseigner sur le mode de vie de MU. La perte des pigments photo-protecteurs existant chez *M. marinum* suggère que MU se développe dans un milieu obscur, de même la perte d'enzymes intervenant dans le métabolisme anaérobie suggère que MU serait limité à des conditions de vie aérobies [128]. Le ralentissement du temps de génération (passant de 4-6h chez *M. marinum* à 72h chez MU) indique également que MU se développe dans un environnement différent de *M. marinum*, et ne serait pas viable si MU avait maintenu des conditions de vie « libre » dans le milieu [128]. Ces différents éléments peuvent être interprétés comme l'adaptation à un hôte, Arthropode ou autre organisme.

## 2.3 Deux modèles de transmission distincts et une large part d'ombre : y a-t-il une circulation de MU dans l'environnement domestique dans les régions endémiques africaines ?

Au final, ces données et expériences dessinent deux tableaux assez différents selon que l'on s'intéresse à l'Afrique ou à l'Australie (Figure 1.5). Les travaux réalisés dans les régions endémiques d'Afrique suggèrent un rôle de l'environnement aquatique, par exemple avec une transmission accidentelle par les Hémiptères, ou par des blessures faites par des objets contaminés (bois, feuilles coupantes…). MU semblerait transmis depuis son habitat initial, qui reste encore à préciser à divers organismes via la chaine alimentaire (Figure 1.5A). Cet habitat pourrait être un biofilm à la surface de plantes aquatiques, le fond vaseux d'un point d'eau ou les tissus d'un hôte animal.

A l'inverse, les travaux réalisés en Australie suggèrent une implication des moustiques, et un réservoir terrestre chez les opossums (Figure 1.5B). Certains auteurs postulent même que l'UB pourrait être une zoonose affectant principalement les marsupiaux, et transmise aux êtres humains par les moustiques [25]. Dans chacun de ces modèles, le niveau de preuve des différents postulats n'est pas le même, et une tentative de synthèse est présentée (Figure 1.5C).

Les différences majeures de climat, d'écosystème et d'urbanisation existant entre le foyer australien de Melbourne et les régions endémiques africaines pourraient justifier l'existence de modèles de transmissions aussi dissemblables. Mais un nombre important de lacunes demeure et rend difficile une comparaison claire des contextes australien et africain. La présence de MU dans les organismes terrestres n'a été étudiée que très partiellement dans les zones endémiques en Afrique. Les opossums sont des marsupiaux endémiques d'Australie, et les échantillonnages de mammifères africains dont on dispose sont insuffisants pour valider leur résultat négatif. L'implication des moustiques ou d'autres arthropodes aériens vecteurs potentiels n'a pas été étudiée, malgré la détection de MU dans les larves aquatiques de moustiques collectées au Ghana ou au Cameroun, et l'identification d'une association entre usage d'une moustiquaire et protection contre l'UB.

Sur la base des éléments qui viennent d'être présentés, et à la suite des travaux présentés au chapitre 2, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait exister une présence, une circulation, voire une transmission de MU dans l'environnement domestique ou péri-domestique des zones endémiques africaines. Le chapitre 4 de cette thèse présente les résultats des travaux entrepris pour tester cette hypothèse dans une zone à forte incidence d'UB. Nous présentons donc pour la première fois des résultats de détection de MU dans la faune aérienne des arthropodes domestiques et péri-domestiques d'un foyer historique d'UB, la région d'Akonolinga au Cameroun.

.

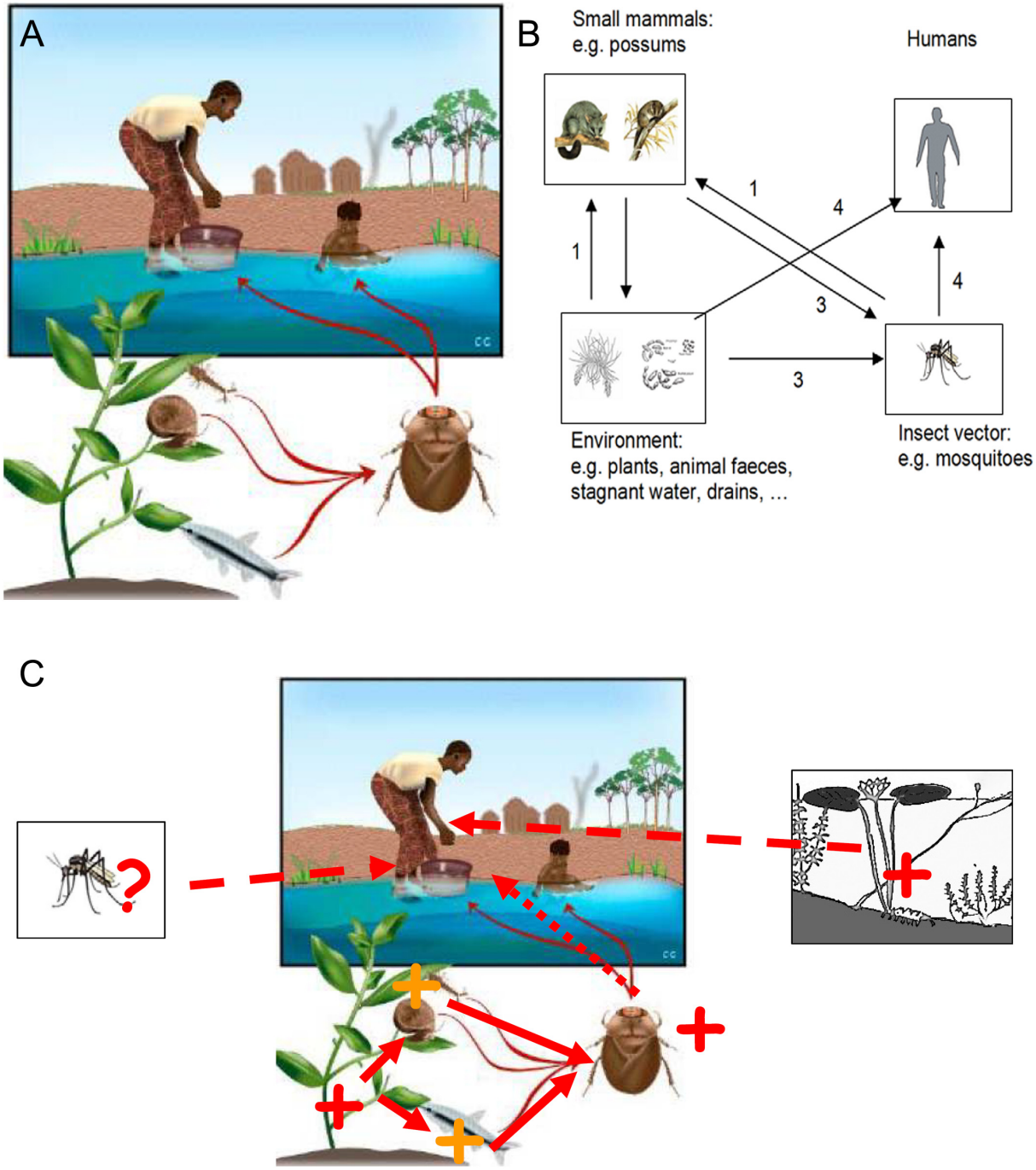



**Figure 1.5 : Modèles proposés pour la transmission de MU.**

A: modèle basé sur les résultats de détection de MU en zone endémique en Afrique : MU se développerait sur les plantes aquatiques et serait transmis le long de la chaîne alimentaire jusqu'à un Hémiptère aquatique, capable de piquer les êtres humains et de transmettre MU [92,94,95,112] ;

B: modèle basé sur les résultats de détection de MU en zone endémique en Australie : MU serait une zoonose en provenance des marsupiaux et transmise, soit par les moustiques, soit par contact avec les fécès [103,115,116].

C: Synthèse présentant le niveau de preuve de la détection de MU dans chaque compartiment soupçonné jouer un rôle dans la transmission à l'être humain.

+ : organisme positif. Jaune : PCR positive, rouge : culture positive. Flèche pointillée : circulation postulée, flèche en trait plein : circulation démontrée expérimentalement. La transmission des Hémiptères aquatiques vers les Mammifères est démontrée au laboratoire sur un modèle de souris, mais il est difficile de documenter la survenue de ce mécanisme dans les zones endémiques.

# Chapitre 2 : Facteurs de risque individuels de l'ulcère de Buruli

## 1. Etude des facteurs de risque d'ulcère de Buruli dans une nouvelle région endémique au Cameroun

L'ulcère de Buruli a été observé au Cameroun depuis les années 1970 au centre du Cameroun dans la zone forestière, dans la vallée du fleuve Nyong, autour des villes d'Ayos et Akonolinga [129]. Malgré l'absence d'informations entre les années 70 et les années 2000 où la maladie fut "redécouverte" [79], les témoignages indiquent que l'UB n'avait pas disparu de la région. En 2004, une enquête nationale a été réalisée afin de détecter d'autres foyers d'UB dans le pays, en particulier dans les zones où les caractéristiques de l'environnement étaient proches de celles des zones endémiques : présence d'un cours d'eau lent avec de fortes inondations, d'un barrage… Cette enquête a permis d'identifier deux nouveaux foyers : Bankim, dans la région de l'Adamaoua et Mbongué dans la région du Sud-Ouest [40].

A la suite des travaux réalisés en 2006 dans la zone d'Akonolinga [47,58], il était important de mieux documenter d'autres zones endémiques et d'y mettre à l'épreuve de la répétition les résultats épidémiologiques obtenus en termes de facteurs de risques.

### 1.1 Caractérisation du foyer de Bankim, une zone d'émergence de l'ulcère de Buruli au Cameroun

Cette caractérisation associe la description des cas d'UB survenus dans la région depuis le début de leur enregistrement systématique en 2007, leur cartographie, et l'étude de la présence de MU dans les Hémiptères aquatiques de cette région. Le principal résultat présenté dans cet article est la confirmation biologique de cas cliniques d'UB dans cette région et l'identification moléculaire de MU dans des Hémiptères aquatiques. Cette étude permet d'identifier les zones les plus touchées et d'émettre de premières hypothèses sur les facteurs associés à la maladie.

La question principale à laquelle il reste difficile de répondre est celle de l'émergence de l'UB. Est-ce une maladie récente dans la région de Bankim ou l'a-t-on simplement détectée récemment ? Un élément indirect en faveur de l'émergence est l'absence de notification de cas de cette maladie par les équipes de l'IRD qui ont travaillé dans la même région au début des années 2000 (Boussinesq M, communication personnelle). D'autre part, durant les 2 ans et demi de recueil de cas dont nous disposions, il apparaissait une diminution de l'âge moyen des cas, que nous avons interprétée comme traduisant une acquisition progressive d'une immunité chez les adultes, un argument supplémentaire en faveur de l'émergence récente de la maladie dans la région. Des travaux complémentaires sur la dynamique d'apparition viennent éclairer cet aspect (Encadré 2.1).

Cette lettre a été publiée dans Emerging Infectious Diseases.

# Geographic Expansion of Buruli Ulcer Disease, Cameroon

**To the Editor:** Buruli ulcer disease (BU) is a necrotizing skin disease caused by *Mycobacterium ulcerans* that affects mostly children in humid, tropical areas (*1*). The exact mode of *M. ulcerans* transmission remains unclear, although the role of water bugs has been supported by various observations and experimental studies (*2*,*3*). We report the identification of a new BU-endemic area in Cameroon, the Bankim district, and specify ecologic and clinical characteristics of *M. ulcerans* infection in this area. These characteristics hint at the possible role of environmental changes (building of a dam several years ago) in the expansion of BU in this area.

Since 1969, only 1 BU-endemic area in Cameroon has been described: the Nyong River basin, where equatorial forest predominates (*4*). In 2004, clinically suspected cases of BU in the district of Bankim have been reported (*5*). This region differs from the first BU-endemic area by geography and climate. Representing a transition between forested south and savanna north, this area has benefited from the building of a dam on the Mape River in 1989, which created an artificial lake of 3.2 billion $m^3$ capacity.

From January 2007 through June 2009, all cases of skin lesions evocative of active BU were recorded as BU probable cases according to World Health Organization guidelines (*6*). During this period, 195 clinically suspected cases were reported from the Bankim health district (Figure). The overall median age for these 195 patients was 19.5 years (interquartile range 10–37 years). No significant difference in age was found according to gender, but a significant trend of decreasing overall median age was found (20 years in 2007 to 12 years in 2009. The most frequent type of lesion was ulcer. Since March 2009, the Centre Pasteur of Cameroon has performed laboratory confirmation for suspected BU cases: microscopic examination for acid-fast bacilli, culture, and *M. ulcerans* DNA detection by PCR (*6*). From April through June 2009, of 34 consecutive samples tested in the reference laboratory, 10 were positive for *M. ulcerans* by at least microscopy and PCR.

Whether BU is emerging in Bankim or is just a newly recognized preexisting disease is difficult to establish. However, that the incidence of BU in the region is increasing is unquestionable. The decreasing median age of patients since 2007 might be consistent with emergence of BU as a new disease in Bankim. This observation could suggest either an increasing level of acquired immunity in the population, leading to protection correlated with age, or the expansion of risky sites for human infection with *M. ulcerans*.

During 1 week in January 2008, water bugs were collected from the artificial lake and water bodies located within or close to each community. A previously described sampling method was used (*2*). To detect *M.*

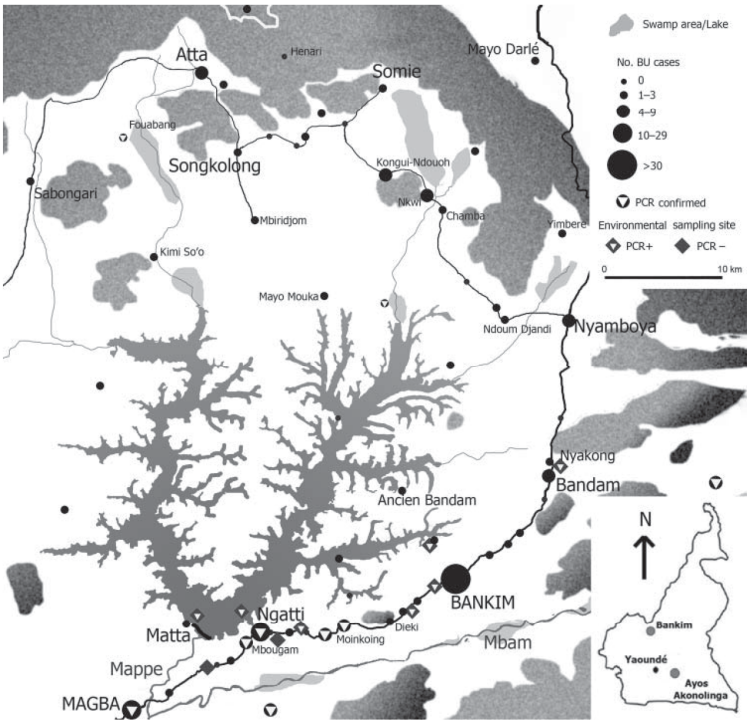



Figure. Distribution of Buruli ulcer (BU) patients reported January 2007–June 2009, and of water bodies with aquatic bugs harboring *Mycobacterium ulcerans*, Cameroon. Inset, Bankim area. A color version of this figure is available online (www.cdc.gov/EID/content/17/3/551-F.htm).

*ulcerans* DNA, we pooled the insects per family in groups of up to 10. Moreover, 99 members of the families Belostomatidae and Naucoridae were kept alive for saliva collection (*2*). The DNA of insect pool homogenized tissues and individual saliva samples were purified. We then searched for *M. ulcerans* molecular signatures (*2*). Among 1,349 insect specimens, 8 from the aquatic Heteroptera families were identified, and 12 (5%) of 244 insect pools were *M. ulcerans* positive. *M. ulcerans*–positive saliva was found in 11 (18%) of 61 insects in the family Belostomatidae and in 3 (8%) of 38 in the family Naucoridae. Water bodies where *M. ulcerans*–positive insects were collected are shown in the Figure.

The emergence of BU may be a consequence of the marked changes in the environment caused by the building of the dam. Elsewhere, human environmental modifications such as construction of dams have been linked with increased incidence of BU (*1*). The main visible environmental effect is the large amount of flooded farmland. According to the seasons, the reservoir margins change the milieu of swamps and meadows. All these modifications affect plant and animal resources in the reservoir area by favoring rapid growth of aquatic macrophyte populations during reservoir filling, thus providing breeding sites for insects and leading to the extinction of area-endemic species and creation of new niches (*7*). These changes might favor development of *M. ulcerans* in biofilms on aquatic plants, which are then ingested by herbivorous animals, which are further prey for water bug predators, hosts, and possible vectors of *M. ulcerans* (*8*,*9*). The water bugs that were most frequently trapped and colonized by *M. ulcerans* (families Belostomatidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae) are carnivorous and able to bite humans (*10*).

Our study confirms expansion of BU in Cameroon. To facilitate detection of new BU foci, and to improve patient treatment (medical, surgical, rehabilitative), health care workers involved in tuberculosis/leprosy control programs should be educated about BU.

## Acknowledgments

We are grateful to the entire health district staff of Bankim involved in data recording, trained by the Ministry of Health and the nongovernmental organization Aide aux Lepreux Suisse, particularly Joseph Sime and Fidele Gaetan Wantong, for their invaluable collaboration.

This work was supported by Réseau International des Instituts Pasteurs (PTR 212, Inter-Pasteurien Concerted Actions, and the foundation Pierre Ledoux-Jeunesse International), the Fondation Raoul Follereau, Institut National de la la Recherche Médicale, and the Conférence des Présidents d'Université–Institut de Recherche pour le Développement (IRD) project (Jeune Equipe Associé à l'IRD-Atomyc).

**Estelle Marion, Jordi Landier, Pascal Boisier, Laurent Marsollier, Arnaud Fontanet, Philippe Le Gall, Jacques Aubry, Noumen Djeunga, Alphonse Umboock, and Sara Eyangoh**

Author affiliations: Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon (E. Marion, J. Landier, P. Boisier, S. Eyangoh); Université d'Angers, Angers, France (E. Marion, L. Marsollier); Institut Pasteur, Paris, France (J. Landier, A. Fontanet); Institut de Recherche pour le Développement, Yaoundé (P. Le Gall); Université de Nantes, Nantes, France (J. Aubry); Hôpital de District de Bankim, Bankim, Cameroon (N. Djeunga); and Aide aux Lépreux Emmaüs Suisse, Yaoundé (A. Umboock)

DOI: 10.3201/eid1703091859

## References


1. Asiedu K, Sherpbier R, Raviglione MC. Buruli ulcer: *Mycobacterium ulcerans* infection. Geneva: World Health Organization; 2000.
2. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, Aubry J, et al. Seasonal and regional dynamics of *M. ulcerans* transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e731. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000731
3. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol. 2002;68:4623–8. DOI: 10.1128/AEM.68.9.4623-4628.2002
4. Pouillot R, Matias G, Wondje CM, Portaels F, Valin N, Ngos F, et al. Risk factors for Buruli ulcer: a case control study in Cameroon. PLoS Negl Trop Dis. 2007;1:e101. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000101
5. Um Boock AKW, Eyangoh S. Enquête nationale préliminaire sur l'ulcère de Buruli au Cameroun. Bulletin de l'Association des Léprologues de Langue Française. 2005;17:41–2.
6. World Health Organization. Buruli ulcer. Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease. In: Portaels F, Johnson P, Meyers WM, editors. A manual of health care providers. WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.4. Geneva: The Organization; 2001.
7. Dai HC, Wang LL, Wang RS. The Three Gorges project and eco-environmental monitoring system. Environmental Informatics Archives. 2006;4:419–26.
8. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Kordulakova J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. PLoS Pathog. 2007;3:e62. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030062
9. Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint Andre JP, Robert R, Legras P, et al. 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. 2004;70:1097–103. DOI: 10.1128/AEM.70.2.1097-1103.2004
10. Andersen. NM, Weir TA. Australian water bugs: their biology and identification. Stenstrup (Denmark): Apollo Books; 2004.


Address for correspondence: Sara Eyangoh, Laboratoire des Mycobactéries, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274, Yaoundé, Cameroon; email: eyangoh@pasteur-yaounde.org

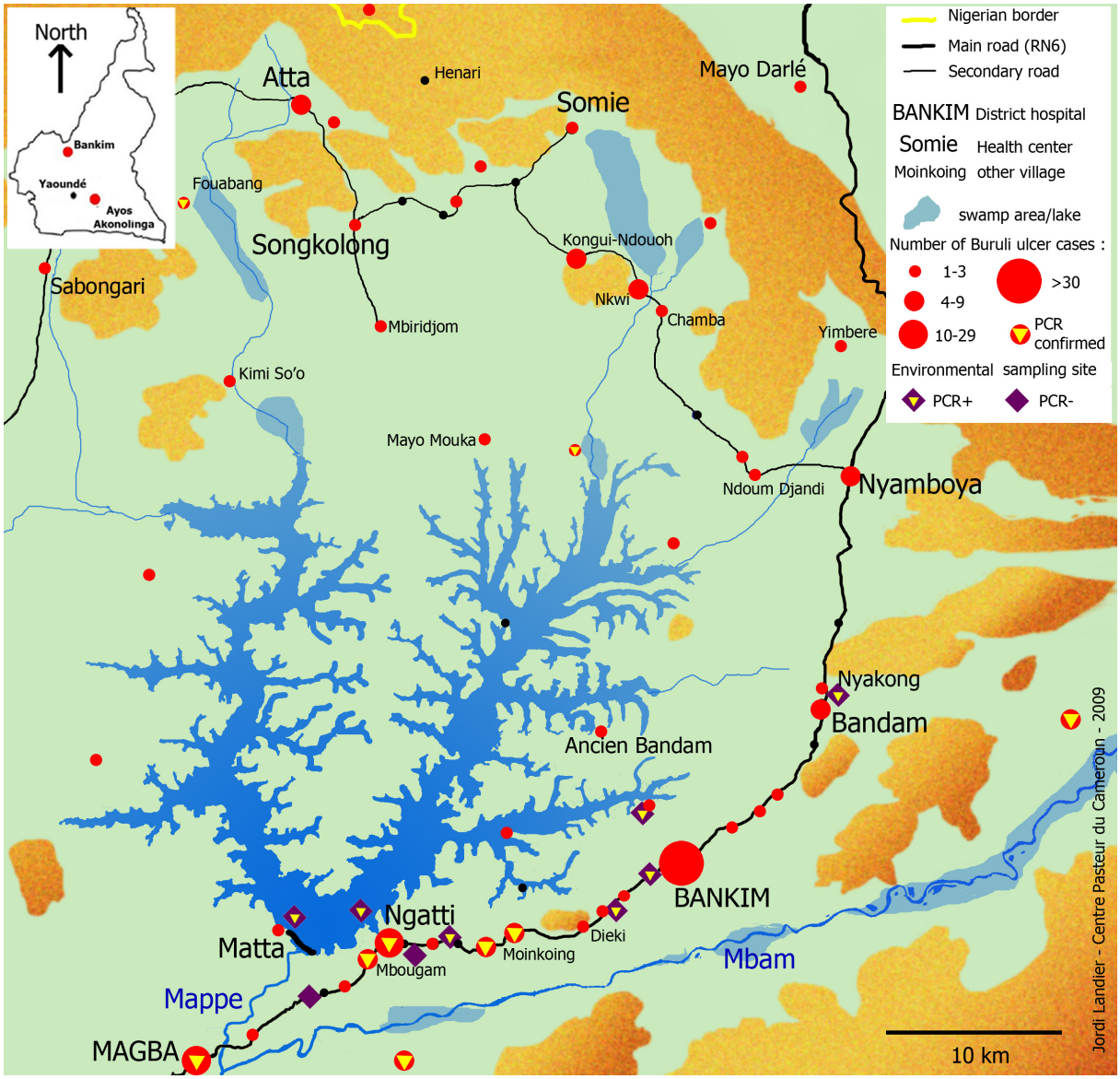



Figure en couleur publiée sur le site d'Emerging infectious diseases

## 1.2 Etude des facteurs de risque de l'ulcère de Buruli à Bankim

A la suite de la caractérisation du foyer d'UB de Bankim, nous avons conduit une étude cas-témoins afin d'identifier les facteurs de risque associés à l'UB dans cette région. Cette étude, qui survenait trois ans après celle réalisée dans la région d'Akonolinga par le Centre Pasteur du Cameroun [58], visait à évaluer les spécificités liées à ce foyer émergent mais aussi les associations reproductibles d'une étude et d'une région à l'autre.

Sur le plan épidémiologique, la réplication de l'étude d'Akonolinga à Bankim permettait de se situer dans un contexte très différent sur le plan climatique, hydrologique, écologique et ethnographique.

Sur le plan de la santé publique, caractériser les facteurs de risque d'un foyer donné permet de proposer des conseils de prévention adaptés au contexte local.

Parmi les facteurs de protection de l'UB, nous souhaitions plus particulièrement vérifier la reproductibilité d'une association entre l'utilisation d'une moustiquaire et une division par deux du risque d'UB, association nouvellement identifiée à Akonolinga.

Les résultats obtenus confirment l'existence d'une association entre utilisation systématique d'une moustiquaire et risque diminué d'UB, et sont dans l'ensemble conformes aux résultats des études précédentes : le rôle protecteur d'une bonne hygiène des plaies est renforcé, certains contacts avec l'environnement aquatique sont identifiés comme à risque, de même le fait de rapporter des lésions de grattage suite à des piqûres d'insectes. Plus éloigné des hypothèses de transmission classique, la culture du manioc était associée à une diminution du risque d'UB. Ces résultats nous ont conduit à considérer le rôle de la moustiquaire comme une hypothèse digne d'intérêt, et nous ont amené par la suite à en tester la plausibilité biologique.

Cet article a été publié dans PLoS Neglected Tropical Diseases.

# Adequate Wound Care and Use of Bed Nets as Protective Factors against Buruli Ulcer: Results from a Case Control Study in Cameroon

**Jordi Landier[1,2,3], Pascal Boisier[2], Félix Fotso Piam[1], Blanbin Noumen-Djeunga[4], Joseph Simé[4], Fidèle Gaetan Wantong[4], Laurent Marsollier[5], Arnaud Fontanet[3,6], Sara Eyangoh[1]***

**1** Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon, **2** Service d'Epidémiologie et de Santé Publique, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon, **3** Unité d'Epidémiologie des Maladies Emergentes, Institut Pasteur, Paris, France, **4** Hôpital de District de Bankim, Bankim, Adamaoua, Cameroon, **5** Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Université d'Angers, Angers, France, **6** Conservatoire National des Arts et Métiers, Chaire Santé et Développement, Paris, France

## Abstract

***Background:*** Buruli ulcer is an infectious disease involving the skin, caused by *Mycobacterium ulcerans*. Its exact transmission mechanism remains unknown. Several arguments indicate a possible role for insects in its transmission. A previous case-control study in the Nyong valley region in central Cameroon showed an unexpected association between bed net use and protection against Buruli ulcer. We investigated whether this association persisted in a newly discovered endemic Buruli ulcer focus in Bankim, northwestern Cameroon.

***Methodology/Principal Findings:*** We conducted a case-control study on 77 Buruli ulcer cases and 153 age-, gender- and village-matched controls. Participants were interviewed about their activities and habits. Multivariate conditional logistic regression analysis identified systematic use of a bed net (Odds-Ratio (OR) = 0.4, 95% Confidence Interval [95%CI] = [0.2–0.9], p-value (p) = 0.04), cleansing wounds with soap (OR [95%CI] = 0.1 [0.03–0.3], $p<0.0001$) and growing cassava (OR [95%CI] = 0.3 [0.2–0.7], p = 0.005) as independent protective factors. Independent risk factors were bathing in the Mbam River (OR [95%CI] = 6.9 [1.4–35], p = 0.02) and reporting scratch lesions after insect bites (OR [95%CI] = 2.7 [1.4–5.4], p = 0.004). The proportion of cases that could be prevented by systematic bed net use was 32%, and by adequate wound care was 34%.

***Conclusions/Significance:*** Our study confirms that two previously identified factors, adequate wound care and bed net use, significantly decreased the risk of Buruli ulcer. These associations withstand generalization to different geographic, climatic and epidemiologic settings. Involvement of insects in the household environment, and the relationship between wound hygiene and *M. ulcerans* infection should now be investigated.

**Citation:** Landier J, Boisier P, Fotso Piam F, Noumen-Djeunga B, Simé J, et al. (2011) Adequate Wound Care and Use of Bed Nets as Protective Factors against Buruli Ulcer: Results from a Case Control Study in Cameroon. PLoS Negl Trop Dis 5(11): e1392. doi:10.1371/journal.pntd.0001392

**Editor:** Xiao-Nong Zhou, National Institute of Parasitic Diseases China CDC, China

**Received** September 15, 2010; **Accepted** September 26, 2011; **Published** November 8, 2011

**Copyright:** © 2011 Landier 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 work was funded by the Programme Transversal de Recherche of Institut Pasteur (PTR 212). J.L. was supported by an internship grant from the Fondation Pierre Ledoux - Jeunesse Internationale. 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: eyangoh@pasteur-yaounde.org

## Introduction

Over the last five years, Buruli ulcer (BU) care has been greatly improved by implementation of antimicrobial therapy and more effective diagnosis methods. However, much about the transmission of this devastating skin disease remains to be learnt. The incidence of BU disease is still on the rise (e.g. in Ghana, Togo and Gabon), and its emergence or increasing incidence have been linked with environmental modifications in rural areas, such as construction of dams or irrigation systems [1]. The main control strategy, based on early detection and early treatment, is hampered in many places by the lack of awareness of the disease and limited access to health services. So far, no primary prevention strategy has been proposed for the population of rural regions where the disease is endemic.

Studies aimed at identifying BU risk factors have repeatedly shown an association between the disease and activities such as wading [2,3] or washing clothes [4] in marshy areas of stagnant or slow-flowing waters. Farming in short clothes was also found to increase the risk of disease [3,4]. Using a protected water source was associated with a decreased risk in some settings [2,5]. Proper care of wounds, such as using alcohol to cleanse wounds, and hygienic practices, such as using soap for bathing, were also repeatedly found protective [2,3,6].

In 2006, a case-control study performed in Akonolinga, in the endemic region of the Nyong valley in central Cameroon, showed for the first time that the use of a bed net was associated with protection against BU [3]. This association was strong and independent of the socio-economic level of individuals, as it was found when comparing cases to both village and family controls.

## Author Summary

*Mycobacterium ulcerans* is the causative agent of Buruli ulcer disease, which causes skin wounds and often results in disabilities. The transmission of *M. ulcerans* remains unknown. Environmental and biological studies have gathered evidence that insects could play a role in *M. ulcerans* circulation. A case-control study performed in central Cameroon in 2007 unexpectedly illuminated an association between bed net use and a decreased risk of Buruli ulcer. As this result suggested a potential domestic transmission involving insects, we set up a new study to investigate whether this association existed in Bankim, a newly discovered Buruli ulcer endemic site in northwestern Cameroon. Our results confirm the protective effect of bed nets in this region, despite very different population, environment, and climate factors. They also confirm the role of good hygienic practices, a protective factor repeatedly identified in previous studies. These repeated associations now warrant further research on a possible domestic or peri-domestic transmission of the disease, involving local water collections and possibly insects.


This finding is consistent with a possible role of insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans*. Several water bugs (aquatic Hemipterans) species [7,8,9,10], as well as mosquitoes [11], have been shown to carry *M. ulcerans* in endemic areas. Furthermore, saliva of Hemipterans captured in the environment has been shown to harbor *M. ulcerans*, and the first *M. ulcerans* culture from an environmental sample was obtained from a semi-aquatic Hemipteran [12].

Laboratory experimental infection of mice bitten by infected water bugs provides important biological support for their involvement [9,13], and mosquitoes-related risk factors have been associated with the disease in Australian epidemiologic studies [14].

Protection against insect bites using a bed net could present a simple, easily implementable means of BU prevention.

We designed this replication study [15] to investigate the association between bed net use and protection against BU in the health district of Bankim, in north-western Cameroon (Figure S1). BU disease was first identified in this region in 2004 [16].

The Bankim BU focus shows several specificities compared to the endemic region of the Nyong river basin in central Cameroon. First, the disease was unknown in the area until recent years (Boussinesq, M. personnal communication). It was reported 15 years after construction of a dam on the Mape River which caused major modifications in the environment and relocations of populations and activities after submersion of villages and farmland. Secondly, the region's geographic, climatic and demographic context differs from that of the forested Nyong River basin. Bankim is located in a transitional zone between forest and savanna and at the foot of the Mambila Mountains; its tropical seasonality is more contrasted than in the equatorial south; and the region is populated by a rich diversity of ethnic groups with specific cultural features. Due to its ecological, demographic and ethnic heterogeneity, Bankim district represented an adequate setting to challenge the hypothesis of bed net use as a protective factor against BU.

Realizing a study in Bankim provided an opportunity to document the other risk factors for BU in this newly discovered focus. It also contributed to raising awareness of BU among Bankim's diverse populations, who considered the disease to result from occult origins and who frequently under-report it.

## Materials and Methods

### Study design and definitions

We conducted a matched case-control study in the district of Bankim, Adamaoua region, Cameroon.

**Cases.** A probable case of BU was defined as a patient presenting with active or inactive BU disease, diagnosed between 1 January 2007 and 15 August 2009 by trained health personnel (specially trained medical doctor and nurse) and treated according to WHO recommendations at the district hospital in Bankim.

A confirmed case was defined as a probable case with laboratory evidence of *M. ulcerans* infection, proved by identification of acid-fast bacilli in stained smears from swabs taken from lesions, amplification of IS*2404* by polymerase chain reaction, or both. Analyses were performed at the Mycobacteria Reference Laboratory in Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, as described previously [3].

Cases originating from outside the health district were not included in the study. Cases reporting having lived with lesions for 10 years or more were not included, since reporting of exposures before the disease would have been inaccurate and comparison with activities of controls over the last year would have been irrelevant.

**Controls.** Two kinds of controls were enrolled.

An eligible community control was defined as a person without signs or symptoms of active or inactive BU and who was not related to a BU case (sibling, parent or living in the same house). Two controls matching cases for age (+/−2 years), sex, and village were randomly selected. Census data was collected in June 2009 by the district "community health agents" during activities of the National Onchocerciasis Control Program. For each village, a list presenting the name, gender and age of each inhabitant was obtained. Using this list, we assigned a number to each person in the village matching a case for age and gender, and then drew randomly five numbers among all numbers assigned. Controls were contacted in the order they were drawn, received preliminary information from the village "community health agent", and were given an appointment for an interview. If this person failed to show up at two successive appointments, we visited the next control on the list until two controls were interviewed. In three instances where census data were not available, we selected as controls the first persons matching age and sex criteria and living in a randomly chosen house in the village.

An eligible familial control was defined as a healthy member of the family closest in age to the case, within the same age class (under 5, between 5 and 12, between 13 and 18, over 18). Siblings of the case were preferentially included, but more distantly related people living in the same household could be included in the absence of siblings.

### Ethics statement

Study enrollment was voluntary. Information was provided first to the village population then individually to the participants. Written informed consent was obtained from case patients and control subjects or from their parents or guardians if participants were younger than 18 years. All BU case patients had received or were currently receiving free treatment for BU at the district hospital, a local clinic or the reference hospital for BU in Ayos. The study protocol was approved by the National Ethics Committee and the Cameroon Ministry of Public Health.

### Sample size

The sample size computed for this matched case-control study required 71 groups of one case and two community controls to

document an odds-ratio of 0.4 or less as statistically significant, with the following assumptions: proportion using bed nets in the control population = 0.5 (as hypothesized based on previous data available [3]), case/control ratio = 0.5, power $(1-\beta) = 0.8$, significance level (alpha) = 0.05, correlation of exposure between groups in the case-control set (phi) 0.2, calculated using PASS (2008, NCSS, trial version). The requested sample size was the same for the case/family control arm, although we anticipated difficulties for including 2 matched controls in some households.

### Data collection

From June 4 to August 16, 2009, study personnel administered a standard questionnaire to participants concerning demographic, environmental and behavioral risk factors. The questionnaire was adapted from Pouillot et al. [3] to fit to the Bankim setting and further questions about bed nets were introduced.

Questions addressed fishing, bathing, washing clothes and domestic water supply activities, as well as farming activities. For all those activities, frequency, localization, and clothes worn were documented, as well as activity-specific details. Frequency was addressed as "daily", "weekly", "monthly", "less than monthly" or "never". Less than monthly frequencies were rarely reported, thus weekly, monthly, and less than monthly frequencies were grouped as "rare to often". "Daily" was coded as "always". Bed net use was considered systematic when people reported sleeping under a bed net every night, all year long. When bed net use was reported seasonal, or irregular, it was classified as "occasional". All questions were close-ended and asked in French whenever possible. Translations into common local languages (Pidgin-english, Fulfuldé and Tikar) were provided by the same interpreter when needed. Cases were interviewed about their activities during the year before the onset of disease, while controls were asked to report their activity during the previous year.

### Statistical methods

Data were analyzed using STATA version 10.0 (STATA Corp. College Station, Texas). Univariate analysis was performed using conditional logistic regression to calculate odds-ratio (OR) and 95% confidence intervals (95%CI). Missing values for a given variable were not included in the univariate analysis of this variable. Variables with p-values lower than 0.25 in univariate analysis were included in a multivariate model.

Multivariate analysis was performed on these variables using multivariable conditional logistic regression after a first step of intra-exposure category selection. Independently associated variables among an exposure category were in a second step introduced in a multi-exposure category model. At each of the two steps, a stepwise backwards procedure was used to remove from the model the variable with the highest p-value until all p-values were less than 0.05. This procedure (clogit) compared nested conditional logistic regression models by a likelihood ratio test.

In the final model, the "interviewer" effect was assessed by creating a variable "interviewer" coded "0" or "1", and by testing whether odds ratios of the significant associations of the final model were "modified" when adding an interaction term between each variable of the final model and the variable "interviewer". Interactions between variables of the final model and age or gender variables were tested using the same method. Age was recoded in 4 categories according to quartiles (<10, 10–13, 14–35, >35).

Preventive fraction was defined as the proportion of cases that could be avoided by systematic exposition of the population to a given protective factor. For instance, the preventive fraction for adequate wound hygiene is the proportion of Buruli ulcer cases that would be avoided if every person in the population cleansed their wounds with soap regularly. Preventive fraction was calculated for each protective factor using the odds ratio estimated in the final model according to the formula developed by Miettinen [17] and Bruzzi [18]:

Preventive Fraction = [P(having disease/unexposed) − P(having disease)]/P(having disease/unexposed) = P(Exposed) × (1 − Odds-Ratio).

## Results

### Participants

Of the 195 probable Buruli ulcer cases recorded in Bankim district hospital since January 2007, 100 cases were contacted, 88 were questioned, and 77 retained for analysis. Only one BU patient refused to participate. Cases were not included or not considered for analysis if they reported having suffered from BU for ten years or longer (n = 11), if one relative (parent, child or sibling) was already included in the study (n = 5) or if their distant location did not allow us to investigate community controls (n = 6). Details of the inclusion process are provided in Figure 1.

Community controls were randomly selected in the population census for 74 cases. For 3 cases living in villages for which census data were not available, controls were included from randomly selected houses. The main reasons for controls not participating were long-term or repeated absence (n = 30, 45%), refusal (n = 14, 21%), unable to be found (n = 8, 12%), or related to a case (n = 5, 7%).

The main analysis was performed on 77 cases (72 probable and 5 laboratory confirmed cases) matched with 153 community controls. Out of 77 cases analyzed, 76 were matched with two controls and one case was matched with one control only.

Familial controls were recruited when available, i.e. mainly for children. Case-familial control analysis was performed on 37 cases and 49 controls. These were distributed as follows: 12 groups of one case and two controls and 25 groups of one case and one control. Among controls, 42 were siblings, 5 were other relatives (half-brother or sister, cousin) and two were unrelated children living in the same household.

### Characteristics of cases

Most patients were healed, except for 16, who presented with lesions still not scarred (Table S1). Five cases could be confirmed, but laboratory confirmation could not be obtained for 11 who were already undergoing treatment.

About as many cases were men (n = 40) as women (n = 37). Median age of analyzed cases was 14 years (Inter-quartile Range (IQR) = [10–36.5]).

Lesions classically presented on lower (n = 39, 49%), and upper limbs (n = 29, 38%). Only 3 patients presented with multiple lesions, and 8 (10%) presented with head or trunk lesions. Median (IQR) time from onset of disease to day of interview was 17 (9–26) months, ranging from 15 days to 7 years.

The majority of patients did not associate their disease with any particular circumstance, but 9 linked it to a wound and 17 to insect bites.

The overall population of the study, presented in Table 1, showed an important heterogeneity of ethnic groups and origins. Tikari and Kwadja farmers are indigenous and represented 33% of controls, but Yamba and Mambila farmers originating from neighboring regions were also well represented, respectively 29% and 12% of the control population, respectively. Kotoko people, originating from the Extreme-North Cameroon, are also found in Bankim, where they settled on the banks of the Mappé Lake and currently handle the commercial fishing business. Fulani-related Mbororos live usually in settlements in the savanna where they traditionally raise cattle. Some of them practice transhumant pastoralism.

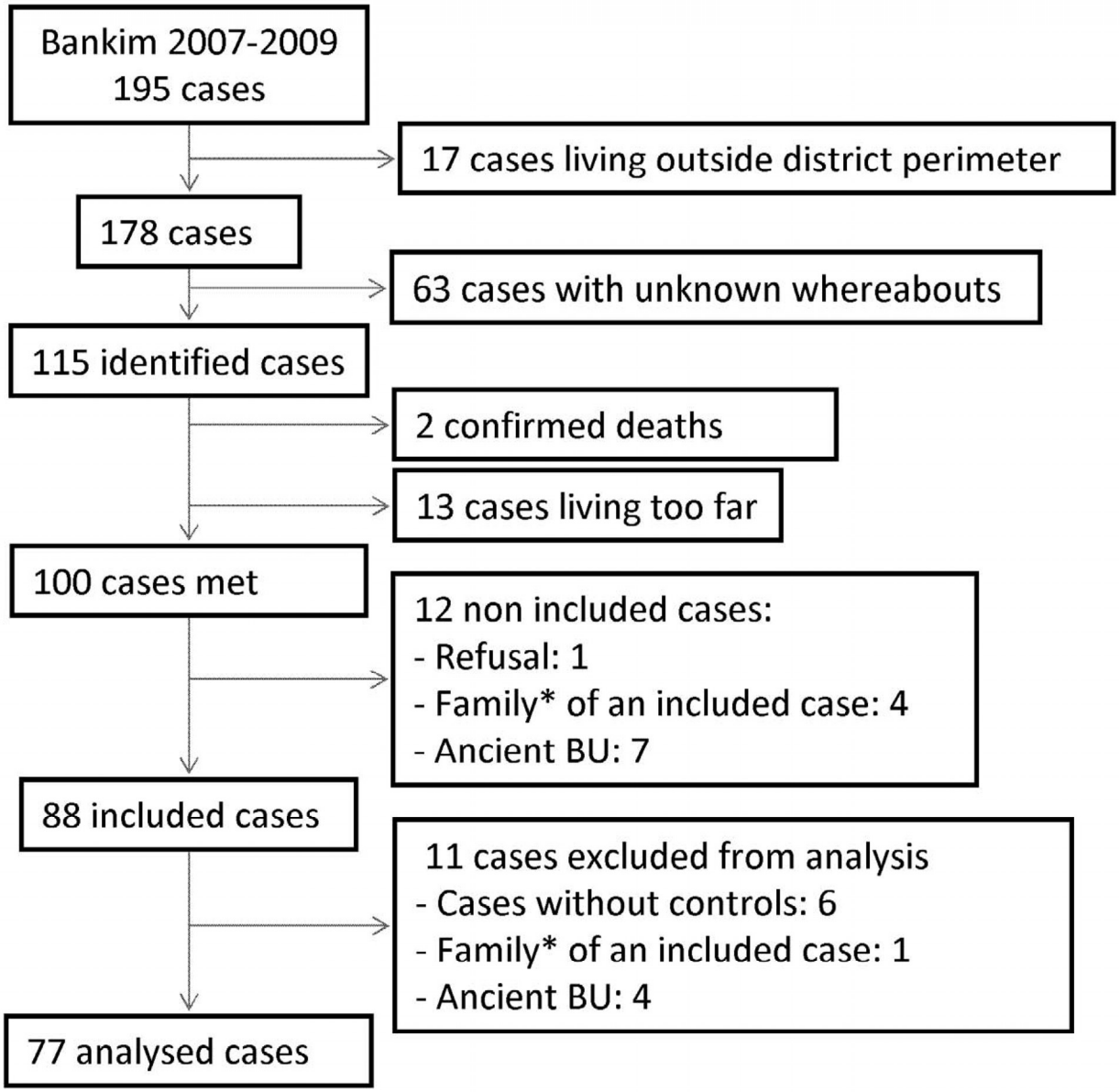



**Figure 1. Flow chart of Buruli ulcer cases recruitment.** * only one case per family was included in the analysis.
doi:10.1371/journal.pntd.0001392.g001

Adults principally engaged in farming activities. Most children between 6 and 12 years old reported going to school (94%), and a majority of them participated in farming during weekends and holidays or during seasons when additional workforce was required (85%). Education level was low with few persons over 12 years of age having secondary education.

## Community-matched case-control study

**Univariate analysis.** Neither ethnic group, activity nor education level was significantly associated with BU (Table 1). A history of BCG vaccination, assessed through the presence of a scar on the forearm, showed a nearly significant protection against BU. Compound environment was associated with an increased risk when small domestic animals such as poultry, ducks, goats or pigs, were present (Odds Ratio (OR) 95% Confidence Interval [95%CI] = 2.6 [1.2–5.7], p = 0.01) and when the compound was close to a water body (OR [95%CI] = 2.6 [1.1–5.8], p = 0.02). Use of specific light source (petrol lamp, electricity) and whether it burnt overnight or not, were not associated with the disease.

Exposure to insects was assessed by questioning about specific insects bites (Table 2). Cases reported more frequently being bitten by hematophagous insects belonging to the *Chrysops* genus (Tabanidae), but the association was not significant. BU was significantly associated with reporting history of small skin lesions due to scratching after an insect bite (OR [95%CI] = 2.1 [1.2–3.7], p = 0.01). Mosquito coils were seldom used and no association with BU was found.

When compared to never using a bed net, systematic bed net use was associated with protection from BU and occasional use was associated with an increased risk (systematic/none: OR [95%CI] = 0.6 [0.3–1.2], occasional/none: OR [95%CI] = 2.5 [1.0–6.4]; p = 0.01).

**Table 1.** Univariate analysis of selected demographic variables for Buruli ulcer in Bankim, Community-matched case-control study.

| Variables | | Cases | | Controls | | OR* | [95%CI]* | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Gender** | Men | 40 | (52) | 79 | (52) | Matching variable | | |
| | Women | 37 | (48) | 74 | (48) | | | |
| **Age (years)** | median [IQR] | 14 [10–34] | | 13 [9–35] | | Matching variable | | |
| **Ethnic group** | Tikari/Kwadja | 26 | (34) | 51 | (33) | 1 | Reference | 0.52 |
| | Fulani (Mbororo/Fulbe) | 2 | (3) | 9 | (6) | 0.4 | [0.1–2.0] | |
| | Mambila | 7 | (9) | 19 | (12) | 0.7 | [0.2–2.1] | |
| | One Tikari parent | 6 | (8) | 9 | (6) | 1.4 | [0.5–4.2] | |
| | Yamba | 26 | (34) | 44 | (29) | 1.3 | [0.5–3.0] | |
| | Kotoko | 3 | (4) | 11 | (7) | 0.4 | [0.1–2.0] | |
| | Other | 7 | (9) | 10 | (7) | 1.6 | [0.5–4.6] | |
| **Main activity** | Activity in the bush | 29 | (38) | 62 | (41) | 1 | Reference | 0.32 |
| | School | 35 | (45) | 72 | (47) | 1.1 | [0.4–3.6] | |
| | Activity in the town | 7 | (9) | 10 | (7) | 1.4 | [0.5–4.0] | |
| | Child <5 years | 6 | (8) | 9 | (6) | NA | NA | |
| **Fishing activity** | Y/N | 27 | (35) | 64 | (42) | 0.7 | [0.4–1.3] | 0.24 |
| **Farming activity** | Y/N | 63 | (82) | 131 | (86) | 0.7 | [0.3–1.6] | 0.35 |
| **Education level** | None | 18 | (23) | 33 | (22) | 1 | Reference | 0.70 |
| | Primary (or coranic) | 19 | (25) | 47 | (31) | 0.7 | [0.3–1.9] | |
| | Secondary | 9 | (12) | 12 | (9) | 1.2 | [0.4–4.4] | |
| | Children <12 years | 31 | (40) | 61 | (40) | NA | NA | |
| **BCG scar** | Present Y/N | 29 | (38) | 76 | (50) | 0.6 | [0.3–1.1] | 0.08 |
| **Compound environment** | | | | | | | | |
| **-Coffee trees** | Y/N | 4 | (5) | 18 | (12) | 0.4 | [0.1–1.2] | 0.09 |
| **-Water collection** | Y/N | 17 | (22) | 16 | (10) | 2.6 | [1.1–5.8] | 0.02 |
| **-Domestic animals** | Y/N | 61 | (79) | 105 | (69) | 2.6 | [1.2–5.7] | 0.01 |
| **No data** | | 1 | | 0 | | – | – | – |

*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression.
doi:10.1371/journal.pntd.0001392.t001

Most bed nets had been bought from the local market and were not insecticide-treated. Net insecticide treatment did not appear associated with better protection, nor did the absence of holes.

Exposure to water was assessed for various activities (Table 3). Fishing was a common secondary occupation among all categories of population but the study included few professional fishermen. Fishing activity, season, place or techniques used were not found to have statistically significant association with the disease.

Bathing activities were separated into bathing for hygiene and for leisure. Bathing for hygiene was statistically associated with an increased risk of BU when baths were taken in the Mbam, a river flowing south from the district (OR [95%CI] = 4.4 [1.2–17], p = 0.02). Bathing in the barrage lake or other water bodies was not associated with a statistically significant change in the risk of disease. Bathing for leisure was a common activity for nearly all children and did not significantly increase risk.

Domestic water supply and clothes washing activities were investigated, but no significant difference in exposure was found between cases and controls. Water sources were mainly rivers, streams or wells. Protected water sources were limited to urban compounds and not necessarily used for all activities. Whether unprotected water sources were running or stagnant was difficult to assess, but no statistically significant association was found between BU and declared characteristics of the water source.

Not wearing shoes during domestic water supply or clothes washing was significantly associated with an increased risk of BU (OR [95%CI] = 6.7 [1.8–24.3], p = 0.002). Type of clothing or shoes worn during any other water-related activity was not associated with a significant risk of BU.

Almost all cases and controls participated in farming activities (Table 4). Youngest children were considered participating when they accompanied their parents. Nearly all farmers planted corn. Growing other food crops was associated with a decreased risk of disease: growing cassava (OR [95%CI] = 0.4 [0.2–0.7], p = 0.001) or beans (OR [95%CI] = 0.5 [0.3–1.0], p = 0.05) presented a significantly decreased risk. Growing banana (sweet or plantain), groundnut and tubers like yam, sweet potato or taro was also associated with a small protection that did not reach significance level. In contrast, commercial crops like coffee and pepper were not associated with disease.

Cases were more likely than controls to have a longer walking time to their fields and to sleep there. They more frequently reported cultivating areas that flooded during the rainy season. Cases also more often declared having a garden or a vegetable patch near their houses, and watering these plots was associated with a significantly increased risk.

Clothing worn during farming activities was not associated with a risk of BU.

**Table 2.** Univariate analysis of selected individual variables for Buruli ulcer in Bankim, Community-matched case-control study.

| Variables | | Cases | | Controls | | OR* | [95% CI]* | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Insect bites** | | | | | | | | |
| **- Chrysops sp.** | Never | 7 | (9) | 24 | (16) | 1 | Reference | 0.22 |
| | Rare to often | 51 | (66) | 100 | (65) | 1.8 | [0.7–4.5] | |
| | Every day | 17 | (22) | 25 | (16) | 2.6 | [0.9–7.6] | |
| | Doesn't know | 2 | (3) | 4 | (3) | – | – | |
| **- Simulium sp.** | Y/N | 63 | (82) | 120 | (78) | 1.4 | [0.7–2.8] | 0.40 |
| **- cause scratch wounds** | Y/N | 49 | (64) | 70 | (46) | 2.1 | [1.2–3.7] | 0.01 |
| **Protection** | | | | | | | | |
| **- Mosquito coil use** | Never | 58 | (75) | 122 | (80) | 1 | Reference | 0.49 |
| | Rare to often | 15 | (19) | 21 | (14) | 1.5 | [0.7–3.3] | |
| | Every day | 4 | (5) | 10 | (7) | 0.9 | [0.3–2.9] | |
| **- Bed net use** | Never | 32 | (42) | 59 | (39) | 1 | Reference | 0.01 |
| | Rare to often | 15 | (20) | 11 | (7) | 2.5 | [1.0–6.4] | |
| | Every day | 30 | (39) | 81 | (53) | 0.6 | [0.3–1.2] | |
| | ND | 0 | | 2 | | – | – | |
| **Bed net characteristics** | | | | | | | | |
| **- Insecticide treated** | No net | 32 | (42) | 59 | (39) | 1 | Reference | 0.74 |
| | Never | 28 | (36) | 66 | (43) | 0.8 | [0.4–1.6] | |
| | Not recently | 6 | (8) | 9 | (6) | 1.3 | [0.4–3.9] | |
| | Recently | 11 | (14) | 18 | (12) | 1.2 | [0.4–3.1] | |
| | ND | 0 | | 1 | | – | – | |
| **- With holes** | No net | 32 | (92) | 59 | (39) | 1 | Reference | 0.66 |
| | Yes | 27 | (35) | 62 | (41) | 1.1 | [0.5–2.4] | |
| | No | 18 | (23) | 31 | (20) | 0.8 | [0.4–1.6] | |
| | ND | 0 | | 1 | | – | – | |
| **Wound treatment practices** | | | | | | | | |
| **- use leaves** | Yes/No | 34 | (44) | 76 | (50) | 0.7 | [0.4–1.4] | 0.36 |
| **- use soap** | Yes/No | 11 | (14) | 58 | (38) | 0.1 | [0.1–0.4] | <0.001 |
| **- use alcohol** | Yes/No | 20 | (26) | 63 | (41) | 0.5 | [0.3–0.9] | 0.02 |
| **- use ointment** | Yes/No | 42 | (55) | 77 | (50) | 1.1 | [0.6–2.0] | 0.67 |
| **- no treatment** | Yes/No | 12 | (16) | 14 | (9) | 1.9 | [0.8–4.4] | 0.14 |
| **Treatment frequency** | No treatment | 8 | (10) | 11 | (7) | 1 | Ref | 0.70 |
| | ≤1 time/week | 20 | (26) | 41 | (27) | 0.7 | [0.2–1.9] | |
| | >1 time/week | 49 | (64) | 99 | (65) | 0.6 | [0.2–1.8] | |
| | ND | 0 | | 2 | | – | – | |
| **Dressing frequency** | No bandage | 39 | (51) | 58 | (38) | 1 | Ref | 0.03 |
| | ≤1 time/week | 14 | (18) | 22 | (14) | 1.0 | [0.4–2.3] | |
| | >1 time/week | 22 | (29) | 73 | (48) | 0.5 | [0.2–0.9] | |
| | ND | 2 | | 0 | | – | – | |
| **Take tablets** | Yes/No | 19 | (25) | 49 | (32) | 0.6 | [0.3–1.2] | 0.16 |

*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression.
Selected variables are presented among the following categories: insect exposure, insect protection and wound care.
doi:10.1371/journal.pntd.0001392.t002

Wounds were frequent in the population, and were usually acquired during farming activities (Table 3). Controls reported being wounded while clearing the field more often than cases.

Several wound treatments were associated with a change in BU risk: using alcohol or soap to cleanse the wound were protective practices, while using no treatment led to an increased risk of disease. Rubbing leaves (usually the sap of a common Lamiaceae referred to as "benjamin") or applying ground tablets or ointment bought on the market was not significantly associated with the risk of BU disease. Dressing the wound was a protective practice when the bandage - either a piece of cloth or adhesive bandage - was regularly changed.

**Table 3.** Univariate analysis of selected water exposures for Buruli ulcer in Bankim, Community-matched case-control study.

| Activities | | Cases | | Controls | | OR* | [95%CI]* | P* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Fish** | Never | 40 | (52) | 75 | (49) | 1 | Reference | 0.84 |
| | Rare to often | 17 | (22) | 38 | (25) | 0.8 | [0.4–1.7] | |
| | Every day | 20 | (26) | 40 | (26) | 0.9 | [0.4–1.9] | |
| **Bathe in water collections** | | | | | | | | |
| **-for hygiene** | Never | 23 | (30) | 58 | (38) | 1 | Reference | 0.45 |
| | Rare to often | 15 | (19) | 26 | (17) | 1.5 | [0.6–3.5] | |
| | Every day | 39 | (51) | 69 | (45) | 1.5 | [0.8–3.0] | |
| **Bathing place** | Barrage Y/N | 13 | (17) | 24 | (16) | 1.1 | [0.5–2.5] | 0.78 |
| | Mbam Y/N | 8 | (10) | 5 | (3) | 4.4 | [1.2–17] | 0.02 |
| | Other river Y/N | 34 | (44) | 68 | (44) | 1 | [0.5–1.8] | 1 |
| **-for leisure** | Never | 35 | (45) | 83 | (54) | 1 | Reference | 0.28 |
| | Rare to often | 16 | (21) | 23 | (15) | 1.9 | [0.8–4.4] | |
| | Every day | 26 | (34) | 43 | (28) | 1.5 | [0.7–3.3] | |
| | ND | 0 | | 4 | (3) | – | | |
| **Wash clothes** | Never | 6 | (8) | 20 | (13) | 0.6 | [0.2–1.8] | 0.16 |
| | Rare to often | 15 | (20) | 18 | (12) | 1.6 | [0.8–4.2] | |
| | Every day | 56 | (73) | 115 | (75) | 1 | Reference | |
| **Carry water for household** | Never | 17 | (22) | 26 | 17 | 1.6 | [0.6–4.2] | 0.49 |
| | Rare to often | 19 | (25) | 44 | (29) | 0.9 | [0.4–1.9] | |
| | Every day | 41 | (53) | 83 | (54) | 1 | Reference | |
| **Domestic water** | Unprotected | 65 | (84) | 116 | (76) | 1 | Reference | 0.23 |
| **source** | Protected | 6 | (8) | 17 | (11) | 0.5 | [0.2–1.7] | |
| | Not applicable | 6 | (8) | 20 | (13) | 0.5 | [0.2–1.4] | |
| **Clothes worn during household water activities** | | | | | | | | |
| **Lower body** | Long | 40 | (52) | 78 | (51) | 1 | Reference | 0.36 |
| | Short or none | 32 | (42) | 59 | (39) | 1.0 | [0.5–2.0] | |
| | Not applicable | 4 | (5) | 15 | (10) | 0.4 | [0.1–1.6] | |
| | ND | 1 | | 1 | | – | – | |
| **Upper body** | Long | 9 | (12) | 15 | (10) | 1 | Reference | 0.34 |
| | Short or none | 63 | (82) | 122 | (80) | 1.2 | [0.5–3.0] | |
| | Not applicable | 4 | (5) | 15 | (10) | 0.4 | [0.1–1.6] | |
| | ND | 1 | | 1 | | – | – | |
| **Shoes** | No | 14 | (18) | 7 | (5) | 6.7 | [1.8–24.3] | 0.002 |
| | Yes | 58 | (75) | 128 | (84) | 1 | Reference | |
| | Not applicable | 4 | (5) | 15 | (10) | 0.7 | [0.2–2.9] | |
| | ND | 1 | | 3 | | – | – | |

*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression.
doi:10.1371/journal.pntd.0001392.t003

**Multivariate analysis.** For multivariate analysis, the main exposure "bed net use" was recoded in two categories, "Systematic bed net use Yes/No" by pooling the two categories "Never" and "Rare to often", which were both associated with an increased risk of disease in the univariate analysis (Table 5).

Independent factors associated with an increased risk of BU were bathing for hygiene in the Mbam River (OR [95%CI] = 6.9 [1.4–35], p = 0.02) and reporting small scratch wounds after insect bites (OR [95%CI] = 3.8[1.0–14], p = 0.03). Factors independently associated with a decreased risk were systematic use of a bed net (OR [95%CI] = 0.4 [0.2–0.9], p = 0.04), use of soap to cleanse wounds (OR [95%CI] = 0.1 [0.03–0.3], p<0.001) and growing cassava (OR [95%CI] = 0.3 [0.2–0.7], p = 0.005).

No significant interaction was found in the final model between variables and a variable "interviewer". No significant interaction was found between these variables and age category or gender. Detailed results of variable selection process are provided in supplementary text S1.

## Family-matched case-control study

Univariate analysis showed a few associations that did not reach significance level (table S2). Of note among those were: bed net use

**Table 4.** Univariate analysis of farming activity variables for Buruli ulcer in Bankim, Community-matched case-control study.

| | | Cases | | Controls | | OR* | [95%CI]* | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Farming activities+** | Y/N | 71 | (92) | 145 | (95) | 0.6 | [0.2–2.0] | 0.4 |
| **Cultures** | Corn Y/N | 71 | (92) | 143 | (93) | 0.8 | [0.3–2.4] | 0.71 |
| | Coffee Y/N | 20 | (26) | 47 | (31) | 0.8 | [0.4–1.5] | 0.44 |
| | Banana Y/N | 21 | (27) | 55 | (36) | 0.7 | [0.4–1.2] | 0.19 |
| | Cassava Y/N | 45 | (58) | 122 | (80) | 0.4 | [0.2–0.7] | 0.001 |
| | Ground-nut Y/N | 56 | (73) | 124 | (81) | 0.6 | [0.3–1.2] | 0.12 |
| | Beans Y/N | 14 | (18) | 46 | (30) | 0.5 | [0.3–1.0] | 0.05 |
| | Tubers Y/N | 33 | (43) | 80 | (52) | 0.7 | [0.4–1.2] | 0.15 |
| | Pepper Y/N | 12 | (16) | 33 | (22) | 0.7 | [0.3–1.4] | 0.27 |
| **Farming area** | Mbam Y/N | 44 | (57) | 82 | (54) | 1.3 | [0.6–2.8] | 0.52 |
| | Barrage Y/N | 22 | (29) | 54 | (35) | 0.6 | [0.3–1.3] | 0.19 |
| **Walking time to field** | <45 min | 22 | (29) | 67 | (44) | 1 | Reference | 0.10 |
| **(self estimated)** | Around 1 h | 22 | (29) | 34 | (22) | 1.9 | [0.9–3.9] | |
| | 1.5 h and more | 25 | (32) | 40 | (26) | 2.0 | [0.9–4.4] | |
| | Unknown | 6 | (8) | 8 | (5) | – | – | |
| | Not going to field | 2 | (3) | 4 | (3) | – | – | |
| **Submersed field** | Yes/No | 20 | (26) | 27 | (18) | 1.7 | [0.9–3.4] | 0.12 |
| **Sleep at the field** | Yes/No | 21 | (27) | 22 | (14) | 2.4 | [1.1–5.0] | 0.02 |
| | ND | 2 | | 8 | | – | – | |
| **Own a "garden"** | | | | | | | | |
| **Nearby compound** | No garden | 55 | (71) | 120 | (78) | 1 | Reference | 0.10 |
| | No | 13 | (17) | 26 | (17) | 1.2 | [0.5–2.8] | |
| | Yes | 9 | (12) | 6 | (4) | 3.4 | [1.1–10.6] | |
| | ND | 0 | | 1 | | – | – | |
| **Water garden** | Yes/No | 19 | (25) | 19 | (12) | 2.8 | [1.2–6.4] | 0.01 |
| | ND | 0 | | 1 | | – | – | |

+children were considered to engage in farming activities when they accompanied their parents to the fields.
*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression.
doi:10.1371/journal.pntd.0001392.t004

which was associated with a decreased risk (OR [95%CI] = 0.4 [0.1–1.4], p = 0.13); watering a garden, associated with an increased risk (OR [95%CI] = 3.1 [0.6–15], p = 0.13); and reporting scratch wounds after insect bites, associated with an increased risk of BU (OR [95%CI] = 2.3 [0.8–6.7], p = 0.10). No significant association with BU was revealed in multivariate analysis (table S2).

### Preventive fraction

If we assume that the relationship between a protective factor and risk decrease is truly causal, we can calculate the proportion of cases in the general population (represented by the controls) prevented by this protective factor, based on the relative risk and the frequency of the factor in the general population (again, represented by controls).

**Table 5.** Multivariable model for risk factors for Buruli ulcer in Bankim, Cameroon, 2007–2009, Community-matched case-control study.

| | | AdjOR | 95%CI | p |
|---|---|---|---|---|
| **Bathing for hygiene in Mbam river** | Yes/No | 6.9 | [1.4–34.7] | 0.02 |
| **Cleanse wounds with soap** | Yes/No | 0.1 | [0.03–0.3] | <0.001 |
| **Grow cassava** | Yes/No | 0.3 | [0.2–0.7] | 0.005 |
| **Always sleep under a bed net** | Yes/No | 0.4 | [0.2–0.9] | 0.04 |
| **Report scratching wounds after insect bites** | Yes/No | 2.7 | [1.4–5.4] | 0.004 |

Log likelihood ratio: 59.32; Likelihood ratio test: LR chi-square = 48.11, $p<10^{-4}$.
doi:10.1371/journal.pntd.0001392.t005

The preventive fraction for systematic bed net use was 32% (proportion of controls systematically using a bed net: 53%, OR = 0.4). Likewise, the fraction of cases prevented by adequate wound hygiene practices (using soap to cleanse wounds) was 34% (proportion of controls using soap: 38%, OR = 0.1).

## Discussion

This study identified practices that demonstrate statistically significant associations with Buruli ulcer in a newly endemic area of northwestern Cameroon. Systematic bed net use, adequate wound hygiene practices, and growing cassava were associated with a decreased risk of disease. Bathing for hygiene in the Mbam River was associated with an increased risk, as well as reporting frequent occurrence of scratch wounds following insect bites.

### Validity of the study

The chosen setting, Bankim district in the Adamaoua region, contrasts with the previous study site. Akonolinga, the previous study site, was characterized by a relative homogeneity: 80% of the population belonged to the same ethnic group, the region was largely forested and water-related activities were centered on a major river, the Nyong [3]. By contrast, Bankim was home to numerous ethnic groups with wider variation in environmental, cultural and health practices. Bankim's environment is a highly varied mosaic of savanna, mountain, and forests. Water-related activities took place in the Mappé reservoir, the Mbam River and many other smaller water bodies (Figure S1).

Our rigorous sampling method, which used census data and repeated appointments with controls, allowed us to capture accurately the heterogeneities of populations and activities in Bankim and to minimize control recruitment associated biases [19]. Case recruitment was performed within the entire district and was not restricted to the most accessible areas.

Similar to case-control studies on BU, the present study has several limits inherent in its methodology and context. First, even if we are confident that our sampling method prevented most sampling biases, memory bias could have occurred: cases were interviewed on their activities during the period preceding the onset of disease and could therefore remember them differently from controls, who were interviewed on their activities over the previous year. However, we included mainly cases with disease diagnoses during the two previous years. This ensured that cases and controls would recall their activities on similar time scales and minimized differential bias. Furthermore, having suffered Buruli ulcer disease could have influenced cases' answers to questions, such as the occurrence of scratch wound as discussed below (rumination bias, [19]). However, most of our identified risk or protective factors are related to less subjective behavioral parameters, which are less likely to be influenced by the disease status.

Finally, this study was performed in a region that is distant from national or regional level healthcare facilities, and where the disease was only recently reported. But in 2007, because of the increasing number of cases, Bankim health personnel were trained at the national Buruli ulcer reference hospital in Ayos on case detection, systematic recording and basic management of cases according to WHO guidelines. These trained personnel implemented these practices in the district. During the period of the present study, a systematic procedure for laboratory case confirmation was set up although only a few cases were confirmed microbiologically. However, clinical diagnosis has been demonstrated to be highly specific when performed by trained health personnel, so that we are confident that almost all clinically-diagnosed Buruli cases were true cases [20]. In a previous study in Akonolinga, Cameroon, analysis of probable and confirmed cases yielded the same risk factors as confirmed cases only [3].

### Protective factors for Buruli ulcer in Bankim

**Protection using a bed net.** This study confirms the association between bed net use and protection against BU, previously shown in Akonolinga, in central Cameroon [3].

The previous study in Akonolinga had shown that the strong association between use of a bed net and protection against BU (OR [95%CI] = 0.4 [0.2–0.8] persisted between cases and controls within the same household (OR [95%CI] = 0.1 [0.3−0.03]), suggesting that it was not confounded by socio-economic status. A larger proportion of adults was included in the present study which made it more difficult to recruit siblings as familial controls. Statistical power is consequently low in the family-matched case-control study. However, use of a bed net still presents a protective effect in this sub-study, which, although not significant, has the same magnitude (OR [95%CI] = 0.4 [0.1–1.4]) as in the community-matched study (OR [95%CI] = 0.4 [0.2–0.9]). While socio-economical status might have confounded the association in the community-matched study, if for instance, participants using bed nets were less likely to have activities exposing them to *M. ulcerans*, it is unlikely to be the case in the family-matched study. Indeed, in this study, cases and their familial controls share the same socio-economical level.

Here we demonstrate that the association between bed net use and protection against BU withstands generalization in a different climatic, geographic, environmental, and ethnic context. This replicative study greatly increases the positive predictive value of the association between bed net use and decreased risk of BU [15].

Few epidemiological studies have investigated the possible role of a bed net as a protective factor against BU in Africa. In Ghana, no significant association was found between bed net use and protection against BU, but the proportion of bed net users in the general population was low (25%), and the 116 pairs of cases and controls only yielded a power 67% to show an OR of 0.4 or less [6]. Furthermore, categories of bed net use grouped "sometimes" and "always" together, probably because of overall infrequent use. In our study, always using a bed net was protective, while sometimes using one was not. Out of two risk-factor studies in Benin, one did not address the question of bed net use [5], while the other showed a small risk increase for bed net users in univariate analysis which disappeared when adjusting for other variables in a multivariate model [2].

The preventive fraction for systematic bed net use was 32% in this study, and reached 43% in the previous study performed in Akonolinga [3]. If this association proves to be causal, bed net generalization could represent a significant mean of protection against the disease that could lead up to one third reduction in the number of cases.

The protective effect of bed nets could result from two different mechanisms. First, using a bed net could protect from direct inoculation of *M. ulcerans* by an insect vector. This hypothesis is consistent with several results from environmental studies. In Australia, *M. ulcerans* infection is now considered a zoonosis transmitted from possum to human by mosquitoes [21,22].

Secondly, bed nets could provide a protection by preventing unspecific insect bites. These bites can lead to small lesions after being scratched which would enable *M. ulcerans* to enter the skin when in contact with contaminated environment. Occurrence of scratch wounds following insect bites was indeed associated with an increased risk of disease in our study. This factor was statistically independent of bed net use as shown by the persistence of both variables in the final model. This result suggests that both

risk factors may act independently, some insect bites being not preventable by bed nets, for instance those occurring at day time.

The association between bed net use and protection against BU underlines the need to broaden environmental studies to aerial insects and to the domestic environment. It would be relevant to assess the presence of *M. ulcerans* in *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes which are important in Africa. Studies on distribution, abundance and *M. ulcerans* positivity of water bugs should not be restricted to the aquatic environment and seek these insects in the domestic environment.

**Protection from adequate wound hygiene.** The strongest protective association was linked to using soap to cleanse wounds. This variable summed up others that implied practices of proper wound care: use of alcohol and frequent bandage changing were also associated with protection, and usually concerned the same people. This association of a decreased risk of Buruli ulcer and good hygiene practices has been found in Ghana [6], Benin [2] and Cameroon [3], indicating that such practices might be one of the most powerful way of avoiding this disease.

This also indicates that while some insects may transmit *M. ulcerans*, other transmission mechanisms are likely to coexist that involve wounds as a port of entry, such as contamination of open wounds by water, or direct inoculation of *M. ulcerans* by a wounding object.

Several mechanisms could explain the decreased risk of disease associated with wound hygiene. Clean wounds heal faster and could be less likely to become a port of entry for the microbe. Frequent wound cleansing could also prevent the survival of the microbe in the skin: since the initial mycobacterial inoculum is expected to be low (3 months median incubation time, [23]) and since the growth rate is very slow, repeated disinfection of skin lesions, or frequent bodily cleansing could help to prevent microbe colonization and subsequent infection, independently of the actual transmission route.

Onset of Buruli ulcer disease after sustaining a wound was reported by 9 cases out of 77 analyzed in this study. This result may well be subject to memory bias. Even so, the role of wounds in the transmission of *M. ulcerans* infection has received little, if any, attention. Symmetrically, the potential role of good hygienic practices has remained poorly investigated by the research community and remains absent from official recommendations, including the WHO BU factsheet [24]. Hygiene-related protective factors have been documented repeatedly and are thus highly relevant to public health. Using published data, we have estimated the preventive fraction for the use of toilet soap for bathing in previous studies and found was 41% in Ghana [6] and 65% in Benin [2]. The preventive fraction for using soap, antibiotic powder or health center care to treat injuries was 53% in Benin [2], while the preventive fraction for using alcohol to treat wounds was 26% in Cameroon [3]. In this study, the preventive fraction of soap use for cleansing wounds was 34%.

While the role of insects in BU transmission remains the cause of much debate and methodological interrogations [25], clarifying the role of hygiene does not seem to have elicited much attention even though most studies confirm its importance. Good hygienic practices could potentially have a major role in community prevention programs.

**Protection from growing cassava.** Our final model also contains an unanticipated protective association with growing cassava. It had also been found in univariate analysis in Ghana [6]. The link between cassava and *M. ulcerans* infection is not obvious; we therefore suspect that in both cases this factor could be associated with an environmental parameter that was not captured by our questionnaires. The main food crop in Bankim is maize, which is highly water-demanding, and Bankim farmers report that cassava grows better in dry, higher grounds. We therefore hypothesize that people growing cassava may work in less swampy, thus less risky areas. Furthermore, bitter cassava is favoured by farmers because insects are less likely to attack it than sweet cassava. Bitter cassava contains toxic cyanoside compounds, and its preparation requires that the tubers be soaked in water, ground to flour and then sundried for several days. During this preparation process, the soaking and drying produce a very intense smell which may possibly repel insects from the domestic area where the preparation takes place.

Of note are also the several univariate associations found between growing certain food crops and a decreased risk of disease. These associations suggest that nutritional status may possibly increase a person's ability to resist *M. ulcerans* infection.

Because this study is the first to show that this factor is significantly associated with a decreased risk of Buruli ulcer disease, we consider that further investigations on the agricultural and nutritional practices are needed before drawing conclusions about its possible role in prevention.

## Risk factors for Buruli ulcer

Bathing for hygiene in the Mbam river was associated with an increased risk of disease. These baths involved people spending long amounts of time near the river for their farming activities and eventually dwelling there during the rainy cultivation season where the waters are high and the banks swampy. Risk increase did not concern leisure baths in the same river, which only took place in the shallow waters during the dry season. This finding is in accordance with numerous previous results identifying slow flowing rivers and stagnant waters as an important source of contamination. The identification of the Mbam river as a risk factor rather than the Mappé reservoir seems at first counter-intuitive, but the reservoir is probably not the direct source of every contamination: some patients had no history of contact with the Mappé lake waters and highest prevalences of BU were not recorded in the fishing settlements on the lake shore but in the villages located between the lake and the Mbam river (figure S1).

Of note, *M. ulcerans* DNA positive water bugs were captured in domestic water collections as well as in the Mappé lake in 2008 [16].

The importance of the peri-domestic water collections as a source of *M. ulcerans* infections remains to be evaluated in terms of *M. ulcerans* presence throughout the year as well as potential vectors or reservoirs breeding sites. Captures targeting water bugs indicated important seasonal variations of abundance and positivity [8], which warrants regular follow-up of microbe and insect populations.

The dam construction may have contributed to BU expansion by providing a broader habitat suitable for proliferation, dissemination and/or survival of *M. ulcerans*, one of its hosts, or an eventual vector. The dam construction in this region impacted drastically on endemicity of onchocerciasis and loasis [26] as well as schistosomiasis (Mouchet F, personal communication).

Increase in BU disease may also result from increased exposure to the environment surrounding the Mbam River where relocated villagers exploit new fields after the dam construction.

The second risk factor identified in this study is more difficult to interpret. Reporting occurrence of scratch wounds after being bitten by an insect was found associated with Buruli ulcer disease. This could be seen as an indication that insect bites are involved in the transmission, either through an insect vector or through unspecific skin lesions from scratching representing a port of entry for *M. ulcerans*. We would however recommend considering this

factor with great caution, as it was only reported and actual sensitivity to insect bites was not assessed. Furthermore, BU cases often reported having suffered intense itching before the onset of the lesion, which they often attributed to an insect bite. This event may have led cases to report being more sensitive to insect bites than controls.

Finally, several risk factors commonly evoked for BU did not present statistically significant associations with the disease in this study. Statistical power was probably insufficient to investigate properly several associations, such as education level (very low) and short clothing related associations (infrequently used for farm work or fishing). Bankim environment's heterogeneity probably prevented us from identifying major water sources of exposure: there is a large number of water bodies, and people change both water-related activities and locations throughout the year because these water sources dry up during the dry season. This may explain why in this study, four behavioral factors and only one location-dependent factor had statistically significant associations with BU in the final model.

## Conclusion

Through this study, we have demonstrated that the association between bed net use and protection against BU, found in a previous case-control study in Akonolinga, can be generalized to another climatic, geographical, environmental and ethnic context. We also identified good wound hygiene as a key protective factor, as reported in several previous studies.

These findings support the hypothesis of a domestic or peri-domestic transmission of *M. ulcerans*, by direct (skin lesions) or indirect (insect bites) contamination involving peri-domestic water collections. We believe that it is now of critical interest to confirm or to rule out the domestic vector hypothesis by investigating insects in the domestic and peri-domestic environment of BU endemic foci. Such study would also help to determine if implementation of bed net protection would help prevent BU transmission.

Furthermore, good hygiene appears again as a key protective factor: using soap to cleanse wounds was found protective, while hygiene baths in the Mbam River increased the risk of disease. Hygienic water sources and behaviors appear to be connected. The link between hygiene and *M. ulcerans* transmission merits investigation in greater detail, so as to promote specific hygienic practices through prevention strategies.

Finally, we believe that while clinical research is making progress in developing oral treatment of Buruli ulcer [27], the research on ecology and transmission of *M. ulcerans* infection should be encouraged so that meaningful and effective prevention strategies can be identified and proposed.

## Supporting Information

**Figure S1** Map of the Bankim area presenting the number of cases per village from January 2007 to August 2009.
(DOC)

**Table S1** Characteristics of the 77 analyzed cases.
(DOC)

**Table S2** Case-family matched control study analysis. Univariate and multivariate analysis results of risk factor analysis in Bankim, Cameroon, 2007–2009.
(DOC)

**Text S1** Details on multivariate analysis (multivariable conditional logistic regression) for case-community matched control analysis of risk factors for Buruli ulcer in Bankim, Cameroon, 2007–2009.
(DOC)

**Protocol S1** Trial protocol.
(DOC)

**Checklist S1** CONSORT checklist.
(DOC)

## Acknowledgments

The authors would like to thank the authorities, health personnel and communities in Bankim for help in setting up and participating in this study. Thanks also to the field team Valentin Angoni and Gustave Nimpang, and Peter J. Kim, Djibril Nguivoum, Estelle Marion, Alexandre Alcaïs, Tamara Giles-Vernick, Jeanne-Marie Amat-Roze, Laura Ciaffi and Elodie Mazoyer, for helpful discussions in preparing and realizing this study.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SE JL PB AF. Performed the experiments: SE JL PB FFP BN-D JS FGW. Analyzed the data: JL PB AF. Contributed reagents/materials/analysis tools: SE BN-D JS FGW LM. Wrote the paper: SE JL PB LM AF.

## References

1. Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portaels F (2006) Mycobacterium ulcerans infection: control, diagnosis, and treatment. Lancet Infectious Diseases 6: 288–296.
2. Nackers F, Johnson RC, Glynn JR, Zinsou C, Tonglet R, et al. (2007) Environmental and health-related risk factors for Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) in Benin. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77: 834–836.
3. 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 Neglected Tropical Diseases 1: -.
4. Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh CR, Diomande I, Saki MZ, et al. (1995) Emergence of Buruli Ulcer Disease in the Daloa Region of Cote-Divoire. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 52: 219–224.
5. Debacker M, Portaels F, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, et al. (2006) Risk factors for Buruli ulcer, Benin. Emerging Infectious Diseases 12: 1325–1331.
6. Raghunathan PL, Whitney EAS, Asamoa K, Stienstra Y, Taylor TH, et al. (2005) Risk factors for Buruli ulcer disease (Mycobacterium ulcerans infection): Results from a case-control study in Ghana. Clinical Infectious Diseases 40: 1445–1453.
7. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection. Lancet 353: 986–986.
8. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, et al. (2010) Seasonal and Regional Dynamics of M. ulcerans Transmission in Environmental Context: Deciphering the Role of Water Bugs as Hosts and Vectors. Plos Neglected Tropical Diseases 4: -.
9. Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, Andre JPS, Small PL, et al. (2005) Colonization of the salivary glands of Naucoris cimicoides by Mycobacterium ulcerans requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. Cellular Microbiology 7: 935–943.
10. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic insects as a vector for Mycobacterium ulcerans. Applied and Environmental Microbiology 68: 4623–4628.
11. Johnson PDR, Azuolas J, Lavender CJ, Wishart E, Stinear TP, et al. (2007) Mycobacterium ulcerans in mosquitoes captured during outbreak of buruli ulcer, Southeastern Australia. Emerging Infectious Diseases 13: 1653–1660.
12. Portaels F, Meyers WM, Ablordey A, Castro AG, Chemlal K, et al. (2008) First Cultivation and Characterization of Mycobacterium ulcerans from the Environment. Plos Neglected Tropical Diseases 2: -.
13. 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 Medicine 4: 288–296.
14. Quek TYJ, Athan E, Henry MJ, Pasco JA, Redden-Hoare J, et al. (2007) Risk factors for mycobacterium ulcerans infection, Southeastern Australia. Emerging Infectious Diseases 13: 1661–1666.
15. Moonesinghe R, Khoury MJ, Janssens AC (2007) Most published research findings are false-but a little replication goes a long way. PLoS Med 4: e28.

16. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, et al. (2011) Geographic expansion of buruli ulcer disease, cameroon. Emerg Infect Dis 17: 551–553.
17. Miettinen OS (1974) Proportion of disease caused or prevented by a given exposure, trait or intervention. Am J Epidemiol 99: 325–332.
18. Bruzzi P, Green SB, Byar DP, Brinton LA, Schairer C (1985) Estimating the population attributable risk for multiple risk factors using case-control data. Am J Epidemiol 122: 904–914.
19. Delgado-Rodriguez M, Llorca J (2004) Bias. J Epidemiol Community Health 58: 635–641.
20. Mensah-Quainoo E, Yeboah-Manu D, Asebi C, Patafuor F, Ofori-Adjei D, et al. (2008) Diagnosis of Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer) at a treatment centre in Ghana: a retrospective analysis of laboratory results of clinically diagnosed cases. Tropical Medicine & International Health 13: 191–198.
21. Johnson PDR, Hayman JA, Quek TY, Janet AM, Jenkin GA, et al. (2007) Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and control of Mycobacterium ulcerans infection (Bairnsdale or Buruli ulcer) in Victoria, Australia. Medical Journal of Australia 186: 64–68.
22. Fyfe JAM, Lavender CJ, Handasyde KA, Legione AR, O'Brien CR, et al. (2010) A Major Role for Mammals in the Ecology of Mycobacterium ulcerans. Plos Neglected Tropical Diseases 4: -.
23. [Anon] (1971) Epidemiology of Mycobacterium-Ulcerans Infection (Buruli Ulcer) at Kinyara, Uganda. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 65: 763-&.
24. WHO Fact Sheet N°199, Revised March 2007.
25. Merritt RW, Walker ED, Small PLC, Wallace JR, Johnson PDR, et al. (2010) Ecology and Transmission of Buruli Ulcer Disease: A Systematic Review. Plos Neglected Tropical Diseases 4: -.
26. Kamgno J, Boussinesq M (2001) [Hyperendemic loaiasis in the Tikar plain, shrub savanna region of Cameroon]. Bull Soc Pathol Exot 94: 342–346.
27. Chauty A, Ardant MF, Marsollier L, Pluschke G, Landier J, et al. (2011) Oral treatment for Mycobacterium ulcerans infection: results from a pilot study in Benin. Clin Infect Dis 52: 94–96.

**Supplementary materials**

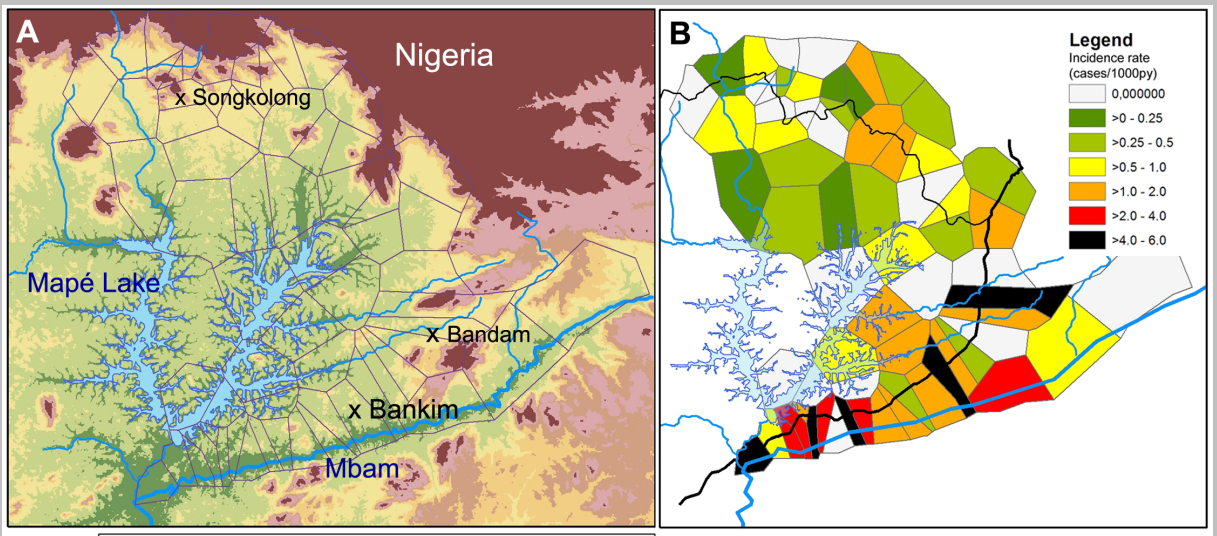
**Table S1: Characteristics of the 77 analyzed cases**

| | | N | (%) |
|---|---|---|---|
| Gender | Male | 40 | (52) |
| | Female | 37 | (48) |
| Age (years) | median [IQR] | 14 | [10-36.5] |
| Case | Probable | 72 | (94) |
| | Confirmed | 5 | (6) |
| Lesion localization | Lower limbs | 36 | (47) |
| | Upper limbs | 30 | (39) |
| | Upper and lower limbs | 3 | (4) |
| | Head, trunk | 8 | (10) |
| Lesion type | Active lesion | 16 | (21) |
| | Scar with incapacity | 16 | (21) |
| | Out of which re-educated | 13 | |
| | Scar without incapacity | 39 | (51) |
| | Other | 6 | (8) |
| Associated event | Wound | 9 | (11) |
| (as reported by patient) | Insect bite | 17 | (22) |
| | Other | 9 | (11) |
| | Unknown | 42 | (56) |

*Les autres éléments du matériel supplémentaire sont présentés en Annexe 3.*

**Encadré 2.1 : L'émergence de l'UB à Bankim.**

Pour aller plus loin, nous avons complété les données recueillies en 2009 pour obtenir une série complète des cas enregistrés à l'hopital de Bankim de janvier 2004 à décembre 2011. Ces données ont ensuite été représentées selon des courbes isochrones de date d'apparition du premier cas dans chaque village (Landier J, Gaudart J, Texier G, non publié).



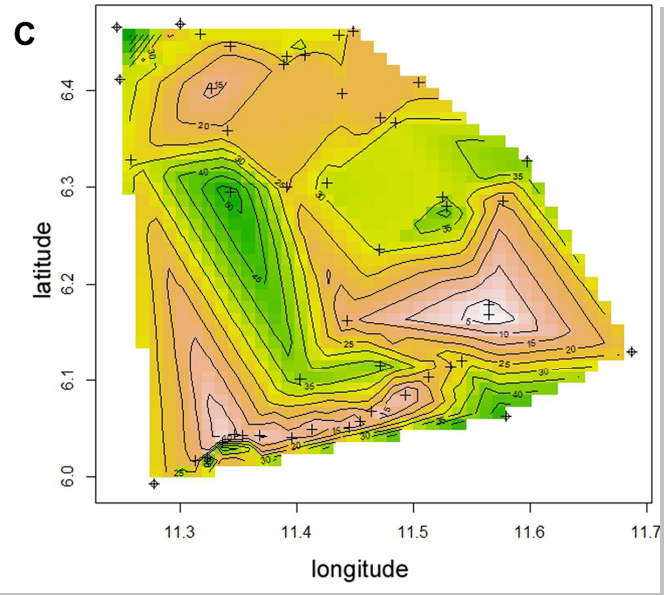




**Figure 2.1 : L'ulcère de Buruli et son émergence dans la région de Bankim.**

A : Environnement physique de la plaine tikar: relief et principaux cours d'eau. B : Incidence cumulative de l'ulcère de Buruli dans les villages de la plaine tikar. La représentation choisie est d'affecter à chaque village un polygone de Thyssen. C : représentation du délai entre le premier cas enregistré (originaire de Bandam) et le premier cas enregistré dans chaque village sous forme de courbes isochrones en nombre de mois.

On note trois "centres" à partir desquels il pourrait y avoir eu diffusion de la maladie ou plutôt du pathogène. Deux d'entre eux sont des zones de forte incidence : la zone de Bandam et la zone située entre le barrage de la Mappé et le Mbam, au sud du district. Une troisième zone pourrait se situer aux alentours de Songkolong. Il est important de noter que la maladie n'est pas présente de façon uniforme autour du barrage, et que les villages de forte incidence sont concentrés dans la partie sud du district, à la fois riveraine du barrage mais aussi du Mbam.

L'UB a souvent été associé à des modifications environnementales et hydrologiques, comme la mise ne place de cultures irriguées et de barrages. A Bankim, le barrage de la Mappé fonctionne en opposition de phase avec les crues du Mbam, dont il maintient le débit en saison sèche. L'effet du barrage pourrait n'avoir été qu'indirect, en permettant le maintien de conditions favorables à MU ou l'un de ses hôtes tout au long de l'année. L'enquête cas-témoins n'a en effet pas identifié d'association avec des activités dans le lac du barrage, mais plutôt avec le Mbam.

## 2. Contribution à la définition de groupes démographiques à risque d'ulcère de Buruli

Ce travail a été permis par la combinaison des données de cas enregistrées en routine par le programme de traitement de l'UB de l'hôpital d'Akonolinga et le service de Mycobactériologie du Centre Pasteur du Cameroun, avec les données de population par classe d'âge et par sexe à l'échelle des arrondissements, obtenues auprès du service du recensement de la population du Cameroun (BUCREP), par l'intermédiaire du Programme Elargi de Vaccination. Disposer de ces deux sources de données nous a permis de calculer un taux d'incidence d'UB par classe d'âge et par genre pour les cas originaires de la région d'Akonolinga. Jusqu'à présent, une seule autre étude récente avait publié ce type de données concernant une région endémique du Bénin (Figure 1.1, [57]). Ces données sont plus robustes que l'analyse simple de la distribution des âges parmi les cas, et permettent de définir des groupes à risque au sein de la population générale : les enfants de 5 à 15 ans, et tout particulièrement les garçons, les femmes de plus de 15 ans, et les personnes âgées.

Cette lettre vient compléter la définition de groupes à risque de sévérité clinique proposée par Quentin Vincent et collègues [22]. Elle a été publiée dans le Lancet Global Health.

**Defining and targeting high-risk populations in Buruli ulcer: a challenge with clinical, epidemiological and public health relevance**

Jordi Landier[1,2], Arnaud Fontanet[1,3], Gaëtan Texier[2,4]

[1] Institut Pasteur, Unité de Recherche et d'expertise en Epidémiologie des Maladies Emergentes, Paris, France

[2] Service d'Epidémiologie et de Santé Publique, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon.

[3] Chaire Santé et Développement, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France

[4] Aix-Marseille Université, UMR912 SESSTIM (INSERM - IRD - AMU), 13005, Marseille, France

Vincent *et al.* analysed 1227 laboratory-confirmed Buruli ulcer (BU) cases and provided clinically relevant results, such as an operational classification of lesions.[1] They reported unbalanced age-gender groups, as previously observed,[2] and an over-representation of BU in children. Quantifying this over-representation is challenging: proper comparisons between age-groups require estimating age-specific incidence rates, which are rarely reported.[2,3] Furthermore, most risk-factors studies rely on age- and gender-matched case-control designs, precluding age and gender comparative analysis.[4]

We report here BU incidence rates for men and women by five-year age-groups for 814 laboratory-confirmed cases in the Nyong River region in Cameroon (Figure 1). Estimates were obtained using BU surveillance data from the Centre Pasteur du Cameroun (National Reference Laboratory for Mycobacteria, Yaoundé, Cameroon) from 2002 to 2012, and detailed 2010-population census data. Incidence rate was twice higher for children aged 5-14 years compared to adults above 15 (165 and 87/100000person-years respectively). Remarkably, incidence rate was stable among adults, suggesting lifelong exposure and possibly increasing vulnerability to disease development among aging individuals. The overall women/men IRR was 1·01 (95% Confidence Interval (95%CI)= 0·88-1·15). Incidence rate ratio was 0·81 (95%CI=0·67-0·98) for 0-14 year old children, 1·55 (95%CI=1·22-1·98) for 15-49 year old adults and 0·85 (95%CI=0·57-1·28) for adults older than 50.

Vincent *et al.* defined age and gender-specific subgroups relevant for clinical considerations.[1] We define three subgroups: boys under 15, 15-50 years old women, and elderly people, which are likely

to have different exposures, behaviours, immunity, and treatment-seeking attitudes. We advocate that this risk categorisation is relevant for epidemiological studies and public health programs such as prevention or case detection campaigns.

**References**


1 Vincent QB, Ardant M-F, Adeye A, *et al.* Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study. *Lancet Glob Heal* 2014; **2**: e422–e430.

2 Debacker M, Aguiar J, Steunou C, *et al.* Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity. *Trop Med Int Health* 2004; **9**: 1297–304.

3 Revill WLD, Barker DJP. Seasonal distribution of mycobacterial skin ulcers. *Brit J prev soc Med* 1972; **26**: 23–7.

4 Jacobsen KH, Padgett JJ. Risk factors for Mycobacterium ulcerans infection. *Int J Infect Dis* 2010; **14**: e677–81.

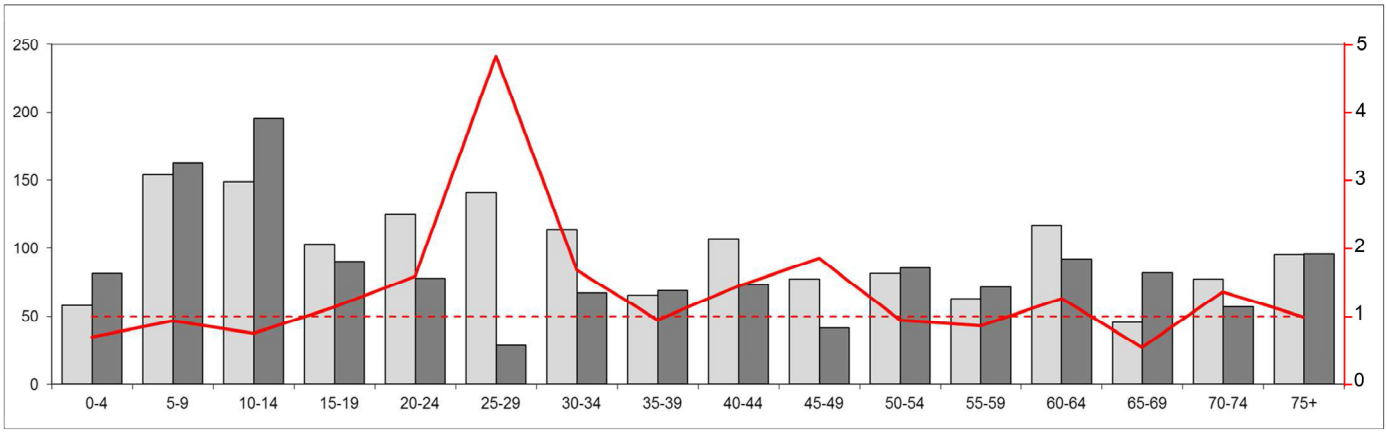




Figure 1: Incidence rate and women/men incidence rate ratio (IRR) of Buruli ulcer in the Nyong River valley (cases/100,000 person-years), 2002-2012, Cameroon.

Light grey: Female; Dark grey: Male

Red line: age-group specific Women/Men IRR

Red dashed line: IRR=1

**Encadré 2.2 : Démographie des groupes à risque à Bankim.**

La même représentation est présentée ci-dessous pour la région de Bankim. Entre 2006 et 2012, 332 cas ont été enregistrés, 169 femmes et 163 hommes. On y constate la même tendance générale qu'à Akonolinga et au Bénin en termes d'incidence par classe d'âge : les enfants et les personnes plus âgées présentent les taux d'incidence les plus élevés. Cependant, le pic d'incidence est limitée au groupe des 10-14 ans chez les enfants, et les différences hommes-femmes sont moins marquées qu'à Akonolinga, bien que l'incidence soit plus forte chez les hommes que chez les femmes entre 10 et 14 ans et chez les femmes que chez les hommes entre 20 et 30 ans. Cependant les effectifs sont plus faibles qu'à Akonolinga, donc l'incertitude plus importante. Il est tout à fait vraisemblable que ces différences traduisent des expositions différentes, liées aux caractéristiques de l'environnement ou aux habitudes des populations, ou simplement au caractère émergent de la maladie.

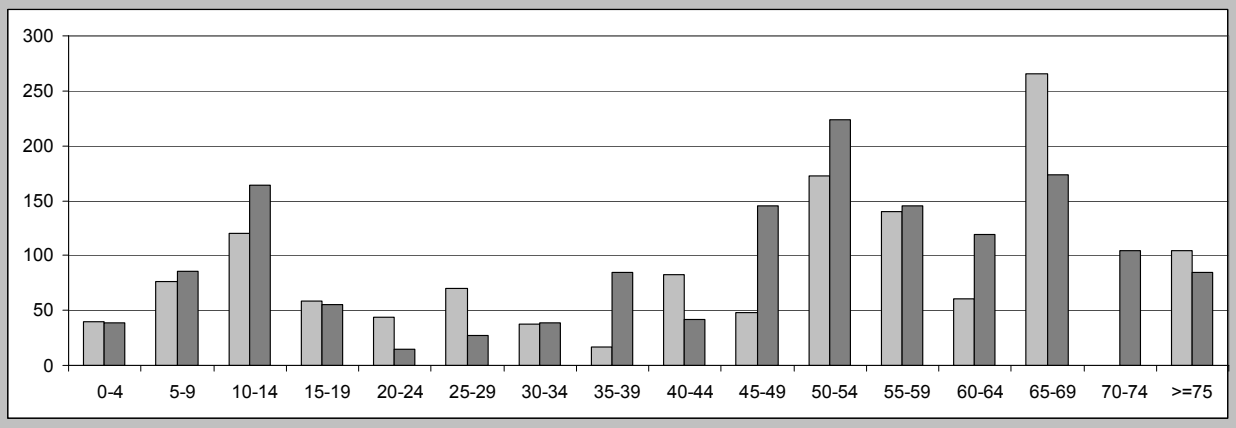



**Figure 2.2 : Taux d'incidence par catégorie d'âge et par sexe pour la région de Bankim, 2006-2012.**
cas/100 000 personnes.années. gris clair: femmes, gris foncé, hommes.

# Chapitre 3 : Analyses spatiales et temporelles de l'incidence d'Ulcère de Buruli dans la région endémique d'Akonolinga, Cameroun

Ce travail s'appuie sur l'analyse de la cohorte des patients traités pour l'ulcère de Buruli à l'hôpital de district d'Akonolinga dans le cadre du programme de traitement de l'UB de Médecins Sans Frontières Suisse (MSF-CH). Cette cohorte fait partie de quelques rares séries de données récentes et bien caractérisées dont on dispose pour l'ulcère de Buruli en Afrique sub-saharienne [22]. Cette série de données comprend plus de 900 cas survenus entre 2002 et 2012 dans l'un des 170 villages rattachés au district de santé d'Akonolinga, un bassin de population d'environ 60000 habitants. La qualité de l'enregistrement permet de localiser la survenue des cas dans l'espace à l'échelle du village, et dans le temps au mois de diagnostic. On dispose aussi de données de confirmation biologique pour plus de 60 % de ces patients.

Ces données permettent l'étude de la répartition spatiale de l'UB à l'échelle locale, et la caractérisation des variations de l'incidence dans l'espace et dans le temps, ainsi que la recherche d'associations entre les différents paysages observables dans la région d'Akonolinga et leur incidence respective d'UB. Ces données permettent aussi l'étude des variations mensuelles de l'incidence.

## 1. Analyse de la distribution spatiale et spatiotemporelle de l'ulcère de Buruli, et association entre paysages et risque de maladie dans la région d'Akonolinga, Cameroun

L'objectif de ce travail était d'étudier la distribution spatiale de l'ulcère de Buruli à une échelle compatible avec la description des activités humaines, et donc avec la mise en œuvre d'éventuelles stratégies de contrôle ou de prévention. En effet, la plupart des autres travaux déjà réalisés et présentés en introduction portent sur des données agrégées à une échelle supérieure au village, et ne peuvent que décrire les conditions environnementales générales régnant sur les régions endémiques. Notre approche visait, malgré l'absence de données individuelles sur les lieux fréquentés par les cas, à définir les catégories d'environnements auxquelles sont exposés les habitants des villages de la zone d'Akonolinga, et à caractériser ensuite le risque d'UB associé à chacun de ces environnements.

Les résultats principaux de ce travail sont: la quantification du rôle du fleuve Nyong et de la distance à laquelle s'exerce son influence, la caractérisation de différents paysages à risque le long du fleuve marqués par des niveaux de risque et des dynamiques d'incidence également différentes. Environ 40 % des variations de l'incidence de l'UB dans les villages de la zone d'Akonolinga peuvent être attribuées à des facteurs environnementaux. Les zones à haut risque et incidence stable sont situées en bordure de la plaine d'inondation du Nyong, présentent une importante superficie de marécages, dont certains sont cultivés, et sont très déboisées. Les zones à bas risque, au contraire, sont caractérisées par une couverture forestière importante et peu dégradée. Enfin, nous avons également identifié des paysages dont le niveau de risque est intermédiaire, mais dont l'incidence est en augmentation. Ils se caractérisent par un couvert forestier dégradé voire en cours de dégradation.

Cet article a été publié dans PLoS Neglected Tropical Diseases.

# Spatio-temporal Patterns and Landscape-Associated Risk of Buruli Ulcer in Akonolinga, Cameroon

**Jordi Landier[1,2]*, Jean Gaudart[3], Kevin Carolan[4], Danny Lo Seen[5], Jean-François Guégan[4], Sara Eyangoh[6], Arnaud Fontanet[1,7], Gaëtan Texier[2,3]**

**1** Institut Pasteur, Unité de Recherche et d'expertise en Epidémiologie des Maladies Emergentes, Paris, France, **2** Service d'Epidémiologie et de Santé Publique, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon, **3** Aix-Marseille Université, UMR912 SESSTIM (INSERM - IRD - AMU), Marseille, France, **4** UMR MIVEGEC 5290 CNRS - IRD - Université de Montpellier I - Université de Montpellier II, Montpellier, France, **5** UMR TETIS, CIRAD, Montpellier, France, **6** Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon, **7** Chaire Santé et Développement, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France

## Abstract

***Background:*** Buruli ulcer (BU) is an extensively damaging skin infection caused by *Mycobacterium ulcerans*, whose transmission mode is still unknown. The focal distribution of BU and the absence of interpersonal transmission suggest a major role of environmental factors, which remain unidentified. This study provides the first description of the spatio-temporal variations of BU in an endemic African region, in Akonolinga, Cameroon. We quantify landscape-associated risk of BU, and reveal local patterns of endemicity.

***Methodology/Principal Findings:*** From January 2002 to May 2012, 787 new BU cases were recorded in 154 villages of the district of Akonolinga. Incidence per village ranged from 0 (n = 59 villages) to 10.4 cases/1000 person.years (py); median incidence was 0.4 cases/1,000py. Villages neighbouring the Nyong River flood plain near Akonolinga town were identified as the highest risk zone using the SPODT algorithm. We found a decreasing risk with increasing distance to the Nyong and identified 4 time phases with changes in spatial distribution. We classified the villages into 8 groups according to landscape characteristics using principal component analysis and hierarchical clustering. We estimated the incidence ratio (IR) associated with each landscape using a generalised linear model. BU risk was highest in landscapes with abundant wetlands, especially cultivated ones (IR = 15.7, 95% confidence interval [95%CI] = 15.7[4.2–59.2]), and lowest in reference landscape where primary and secondary forest cover was abundant. In intermediate-risk landscapes, risk decreased with agriculture pressure (from IR[95%CI] = 7.9[2.2–28.8] to 2.0[0.6–6.6]). We identified landscapes where endemicity was stable and landscapes where incidence increased with time.

***Conclusion/Significance:*** Our study on the largest series of BU cases recorded in a single endemic region illustrates the local evolution of BU and identifies the Nyong River as the major driver of BU incidence. Local differences along the river are explained by wetland abundance and human modification of the environment.

**Citation:** Landier J, Gaudart J, Carolan K, Lo Seen D, Guégan J-F, et al. (2014) Spatio-temporal Patterns and Landscape-Associated Risk of Buruli Ulcer in Akonolinga, Cameroon. PLoS Negl Trop Dis 8(9): e3123. doi:10.1371/journal.pntd.0003123

**Editor:** Mathieu Picardeau, Institut Pasteur, France

**Received** March 26, 2014; **Accepted** July 17, 2014; **Published** September 4, 2014

**Copyright:** © 2014 Landier 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.

**Data Availability:** The authors confirm that, for approved reasons, some access restrictions apply to the data underlying the findings. Data are available on demand at the National Reference Laboratory for BU in Cameroon at the Centre Pasteur du Cameroun. These data belong to the Cameroonian ministry of Health of which the Centre Pasteur du Cameroun belongs. The point of contact is Ms Valérie Flore Donfack Donkeng at LNR PNLUB, Centre Pasteur du Cameroun (+237 22 23 10 15).

**Funding:** This research was supported by a grant from the French National Research Agency ANR 11 CEPL 007 04 EXTRA-MU (http://www.agence-nationale-recherche.fr/). Additional funding was obtained from the Fondation Raoul Follereau (http://www.raoul-follereau.org/). JL is supported by fellowships from the French Ministry of Higher Education and Research and from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT 20130928241). 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.

* Email: jordi.landier@gmail.com

## Introduction

Buruli ulcer (BU) disease is an extensively damaging skin infection caused by *Mycobacterium ulcerans* (MU), a pathogen distantly related to *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae* [1,2]. BU presents as a necrotising infection of the skin, causing debility and crippling deformity if left untreated. Initially described in Uganda and Australia [3], BU has been reported in 33 countries and mainly prevalent in tropical regions. In 2011, 4,009 cases were reported to the World Health Organization (WHO) by 14 countries [4]. The majority of BU cases (96%) originated from countries around the gulf of Guinea and Cameroon reported 256 cases.

Means of preventing the infection are still lacking as the mode of transmission of MU to humans remains unknown [3,5]. It is unclear where the microbe resides in the environment: genomics data suggest recent adaptation to a new environmental niche and specialisation to a given host [6,7] while environmental detection

## Author Summary

Buruli ulcer (BU) remains a mysterious disease without efficient prevention since the mode of transmission of its agent, *Mycobacterium ulcerans*, is still unknown. The disease is highly localised within countries and even at the village scale within endemic regions, but environmental factors explaining this focal distribution have not been described yet. In this article, we rely on a large series of cases originating from Akonolinga region, Centre region, Cameroon, and recorded at the BU treatment center of the hospital of Akonolinga. The series of 787 patients over 10 years allows us to describe the distribution of BU incidence in the region and its changes over time and space. We identify the Nyong River as a major risk factor, and identify environmental factors along the river that further increase the risk of BU, such as the high proportion of swamps, the degradation of forests and cultivation of lands by human populations. These results will help to locate where the transmission is most likely to happen, and provide useful elements for targeting case search, prevention actions and future research on *M. ulcerans* transmission.


studies across a wide diversity of samples (insect and vertebrate fauna, water filtrates, vegetal debris) seem to indicate that the microbe could occupy a wide diversity of environments [5,8–10]. How the microbe reaches human skin is also highly debated: a role of insects as vectors has been hypothesised [9,11], but remains controversial [5].

In this context of unknown transmission mechanisms and unknown environmental location of the pathogen, the study of spatial and temporal variations of BU incidence could identify where and when MU transmission events are most likely to occur and provide insights towards understanding the elusive epidemiology of BU [12,13]. BU incidence has been described as highly focal in countries such as Uganda, Benin, Côte d'Ivoire and Ghana, where endemic regions are usually well defined. In Cameroon, three foci are identified, the Nyong valley in Ayos and Akonolinga (Centre region), Bankim (Adamaoua region) and Mbongue (South-West region), but sporadic cases originate from various places across the country, suggesting that the description of BU endemic regions is incomplete [14]. Descriptive maps of BU incidence or prevalence were established in Uganda as early as the 1970s [15,16]. Since that period, several maps of prevalence or incidence rate have been established in endemic regions from Cameroon [17–19], Democratic Republic of Congo [20], Benin [21], Côte d'Ivoire [22,23] and Ghana [24,25]. These maps showed that the distribution of BU is highly focal at country scale, and also within endemic regions [16,17,19].

Several studies have shed light on spatial patterns of BU distribution and environments associated to BU at the national scale [21,23,26] or at the regional scale [27,28]. The environmental factors associated to BU prevalence or incidence were: low elevation in Benin [21,27] and South Australia [28], high percentage of forest cover and low percentage of urban cover in Côte d'Ivoire [23], Benin [21] and South Australia [28]. In Benin, the standard deviation of wetness index, an indicator of areas with contrasted topographic features, was associated with a higher risk of BU [21]. In Côte d'Ivoire, irrigated rice producing areas and the proximity of remnant rainforest patches were associated with a higher risk of BU [23]. These analyses contributed to identifying the characteristics of the regions at risk within countries, and a model from Benin could even be used to predict where these regions would be in neighbouring Ghana [26]. However, they provided little insight on the local determinants of BU prevalence within endemic regions, where endemic and non-endemic villages can be very close. The spatial resolution was probably too low in these studies to distinguish local variations in prevalence or to provide sufficient contrasts in the descriptions of the environment [26,28].

In this article, we present the first analysis of BU incidence patterns at the village level in an African endemic region, the Akonolinga health district, Centre region, Cameroon. This analysis is based on one of the largest series of cases available to date and on a fine scale characterisation of the environment. The objectives of this study were: 1) to describe the local spatial patterns and spatio-temporal variations of BU incidence; 2) to characterise and quantify the environmental factors associated with high BU incidence in Akonolinga district.

## Materials and Methods

### Setting

This study was performed in Akonolinga health district, located 100 km east from Yaoundé in the Centre Province of Cameroon. The predominant environment is tropical forest and the district is crossed by the Nyong River which flows from east to west. BU was first described in this area in 1977 [29]. BU prevalence in the district was described in 2001 [17] and 2007 [18]. Risk factors for BU have also been investigated in a case control study in 2006 and several individual risk factors related to the environment were identified, such as having activities in the Nyong River, or having forest or a cacao plantation close to the habitation [30]. The present study was conducted based on BU cases recorded for Disease Surveillance activities from January 2002 (start of the treatment intervention) to May 2012.

### BU case data

This study relied on the analysis of the registry [29] of BU patients included in the BU management intervention at Akonolinga District Hospital, for which the Centre Pasteur du Cameroun (CPC) performed biological confirmation of MU infection diagnosis as the National Reference Laboratory. All new patients treated for BU in Akonolinga after clinical diagnosis, and with a documented place of residence in Akonolinga district, were included in the analysis. Patients without a documented village of residence or with an unidentified village of residence were excluded. These data were collected routinely at Akonolinga District Hospital and at Centre Pasteur du Cameroun as part of the BU Disease Surveillance system of the National Control Program.

A clinical case was defined as a patient with a clinical diagnosis of BU, made at the Akonolinga District Hospital, by trained specialized health practitioners in charge of the BU treatment. A confirmed case was defined as a clinical case with a positive result for at least one of the two biological confirmation methods, microscopy [31] or PCR [32] which are performed routinely by the CPC as the National Reference Laboratory according to WHO recommendation [31]. Laboratory confirmation could not always be obtained, however clinical diagnosis was shown to be very reliable in endemic regions [33].

### Ethics statement

This study used anonymised case data, aggregated by village and by month, which were collected by the Service de Mycobactériologie of the Centre Pasteur du Cameroun as part of the surveillance activity of the National Reference Laboratory for BU in Cameroon, within the National BU Control Program.

In this study, no intervention was performed (either diagnostic or therapeutic) and we only relied on a retrospective collection of anonymous cases authorized by the Cameroonian Ministry of Health.

## Population data

Population data for Akonolinga health district villages were obtained from the national population census bureau (BUCREP). These population data were a 2010 projection based on the detailed results of the 2005 census. Population settlements in the Centre region are typically hamlets relatively close to each other which form a village ("chefferie") under the administrative authority of a traditional chief [34,35]. Since cases were reported at the village level, we aggregated the population of hamlets at village level.

For the towns of Akonolinga and Endom, the urban neighbourhoods were aggregated.

## Administrative data

In accordance with Cameroonian laws (decree 77/245), a village was defined as the collection of all hamlets under the jurisdiction of the same traditional chief and was represented on the maps as the surface encompassing all hamlets. Hamlets had been either geolocated using a GPS during previous fieldwork [30,36] or identified on a 1/2,00 000 scale map (Institut National de Cartographie, Yaoundé, sheets of Yaoundé, Nanga Eboko and Akonolinga).

Topographical and environmental data were extracted using a circular 5 km-radius buffer around the village centroid. This value of 5 km was chosen based on a socio-anthropologic evaluation done in the region (described in [37]) and it approximated the distance that could easily be walked by inhabitants for their daily activities: fishing, farming, going to school. Furthermore, each hamlet was located within the 5-km-radius buffer of its village.

## Topographical data

Topography has been shown to be a major driver in most studies [21,23,27]. A digital elevation model was used to obtain elevation data (Shuttle Radar Topography Mission, available from the U.S. Geological Survey). A map of 90 m-topographic wetness index (TWI), an indicator of zones where water tends to accumulate due to abundant runoff from the surrounding area and a low slope, was obtained from Africa Soil Information Service (http://www.africasoils.net). TWI was categorised around the value 18, since following fieldwork, TWI>18 corresponded best to the bottoms of valleys which were most likely to represent wetlands. The percentage of each buffer area within this class was used as an indicator of the abundance of wetlands. Data on the distribution of rivers and roads were obtained from IFORA project and Institut National de Cartographie du Cameroun.

## Environmental data

First, we used aggregated measures to quantify vegetation cover in each buffer. We used a vegetation index calculated from remote sensing multispectral data measured by the MODIS satellite. The Enhanced Vegetation Index (EVI) is available from U.S. Geological Survey as a monthly image with 1 $km^2$ resolution averaging measurements performed with a 16-day period (30-Day L3 Global 1 km product - MOD13A3). EVI was used as a measurement of overall forest cover: it is directly related to photosynthetic activity and biomass and was developed specifically for high biomass areas such as tropical forests [38]. Using images from December 2001 to December 2011, we calculated the mean EVI during the dry season for each village buffer to approximate vegetation cover. During the dry season, contrast was expected to be maximal between herbaceous or cultivated zones, where annual plants require rain for their growth, and forest where perennial vegetation relying on deep soil water, would still present a high photosynthetic activity [39]. Deforestation was one of the major human-driven changes that we expected in this area. We calculated the mean EVI over months December to February at the beginning and end of the study period (dry seasons 2001–2002 and 2011–12). The difference between the two values was included as a crude proxy for quantitative vegetation change over the study period.

Second, we characterised the environment in more detail (forest type, cultivated areas…) using two distinct Land-use/Land-cover (LULC) datasets.

The first dataset was a classification constructed using two Landsat images from February and March 2001 which were selected for low cloud content. Initial exploratory maps were classified using multi-spectral decision trees in the software ENVI, version 4.8 (Exelis Visual Information Solutions, Boulder, Colorado). Following ground truthing of these initial maps in November 2012, they were refined using object orientated image analysis in the software eCognition (eCognition Developer version 8.9.1, Trimble Geospatial Imaging, Munich, Germany). This resulted in regions classified as Urban, Road, Forest, Crop, Flood plain or Swamp categories.

The second dataset was a map of forest types established in 2002 and obtained from the Forest Atlas of Cameroon [40]. The study area presented 9 classes of vegetation: primary forest (dense humid evergreen or with raffia trees), secondary forest (young or adult, cultivated or not), forested wetlands/swamps, wetlands, and savannah. Secondary forest represents forest growing after being cleared (completely or partially). Two categories are distinguished according to the time elapsed since clearing. Young secondary forest corresponds to the first 5 to 20 years after clearing. It hosts mainly plant species that grow rapidly and in the light. With time, the number and variety of plant species increase, the canopy closes and the forest becomes adult secondary forest, characterised by a high biodiversity. In Akonolinga region, clearing resulted mainly from familial agriculture. The forest category indicated the intensity of human pressure on the environment.

The first dataset was used mainly for urban, agricultural, and wetland land-cover characterisation, which were combined with detailed forest data from the second dataset. New classes or new attributions were derived, such as "cultivated wetlands" corresponding to areas listed as cultivated in one dataset and swamp or swamp forest in the other.

## Statistical analyses

All analyses were performed using R software version 3.0.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), including packages DCluster, SPODT, FactoMineR, bcp; and the software ArcGIS version 10.0 (ESRI Inc. Redlands, CA), including the extension Spatial analyst. Graphics were drawn using the ggplot2 R-package and maps were drawn using ArcGIS.

**Incidence rate calculation and mapping.** In order to analyse the distribution of cases in Akonolinga district, a map of the mean monthly incidence rate of BU per village was drawn for each phase and for the cumulative series. Mean incidence rate was expressed in cases per 1,000 person.years (cases/1,000py) and allowed comparisons between villages with different population sizes and different exposure times. To be represented on the maps, incidence rate were discretised using rounded values of the classes

obtained by the Jenks method in ArcGIS, which enabled maximization of contrasts.

**Analysis of spatial clustering.** To address the question of whether cases occurred at random in the district or according to a given spatial pattern, we performed several statistical analyses. First, a general statistic of global aggregation, Moran's Index (I), was calculated to assess spatial autocorrelation [41]. Statistical significance was calculated using bootstrap methods. Then, we evaluated the relative risk of BU over the Akonolinga region using the Spatial Oblique Decision Tree algorithm (R package SPODT). This method was used to identify homogeneous risk areas on the time-aggregated series and to quantify the risk associated with each zone. This method is adapted from classification and regression tree techniques and uses straight lines to split the study area in groups of villages as homogenous as possible regarding incidence rate [42]. It identifies clusters without any shape assumption, and is less biased by edge effects. It also provides risk estimates in all areas. Statistical significance was calculated using Monte-Carlo inference. We estimated the relative risk for each zone delimited by SPODT, by calculating an odds-ratio and its 95% significance interval.

**Spatio-temporal analysis.** Based on the spatial analysis, we analysed the incidence distribution over time and space using a "heat-map", displaying mean monthly incidence for each quarter and for each village after ordering them according to their distance to the Nyong River. We identified several "phases" in the time-series defined as periods of time presenting heterogeneous spatial patterns of incidence. These phases were confirmed using Bayesian change-point detection methods [43] to have a high probability of representing a change in the time series. Maps of incidence were drawn.

**Classification of villages into landscape groups.** We performed a principal component analysis (PCA) on the environmental data extracted for each village on a 5 km-radius buffers (see Supplementary Figure S2 legend in Text S1 for details). This step allowed grouping variables from the different categories, removing colinearity and selecting the most relevant variables for describing the environment in the Akonolinga region. Homogeneous groups of villages with similar landscape environments were built by classifying the villages according to the PCA results using agglomerative hierarchical clustering with a Euclidean distance metric (unsupervised classification).

**Estimation of landscape-associated risk.** In order to estimate the risk associated to each landscape, a generalised linear model (GLM) was built. A binomial negative regression model was preferred, since it was more adapted to this series with count numbers, as in previous BU studies [21]. Categorical variables were included in the model: landscape profile as a single variable with one modality per group, and distance to the Nyong River in 4 categories, $\leq$5 km, >5–10 km, >10–20 km, >20 km, according to the activity range of populations. The model allowed estimation of an incidence ratio (IR) associated to each class. Interaction between landscape profile and distance to the Nyong River was investigated by splitting the landscape classes in groups of distance when all the villages of one landscape were not included in the same distance class. When it was found significant for one landscape, two subsets landscape were created for the final analysis, distance to Nyong $\leq$10 km and >10 km based on the distance where Nyong influence was significant.

Univariate and multivariate models were assessed for parsimony using Akaike information criterion (AIC). Fitting was assessed by the percentage of deviance explained.

To assess model performance at representing the spatial variations of BU incidence we mapped the model residuals and explored their distribution using Moran's I statistic. We expected that no autocorrelation would remain if the model accurately captured the spatial pattern of incidence resulting from the different landscapes.

**Temporal evolution of BU incidence in each landscape.** We drew the cumulative incidence graphs over time for each group of villages from the same landscape to examine the local temporal variations of BU. The cumulative incidence over time was fitted with a linear model. When a linear fit was appropriate and indicated constant incidence, average incidence in the landscape was calculated for the period 2002–2012. Exponential fit was also tested by fitting a curvilinear model to the logarithm of cumulative incidence.

## Results

### BU case data

From January 2002 to May 2012, 915 patients originating from Akonolinga health district were diagnosed and treated free of charge at the Akonolinga district hospital by the BU management intervention. Out of these patients, 853 were new cases and among those, 787 cases had a documented place of residence in one of the 154 villages of Akonolinga district included in the analysis. The total population of the study villages was 60,188 inhabitants and the study area had a surface of 3,685 km$^2$. The north part of the district, 16 villages totalling 10 cases and 2,750 inhabitants, was excluded because the area was only documented in the forest LULC database.

Among the 787 clinical BU cases in the database, 513 (65%) had received a laboratory-confirmed MU infection diagnosis (396 by PCR and/or microscopy, 117 by microscopy only). All 787 clinical BU cases were included in the analysis.

### BU incidence rate and spatial distribution in Akonolinga district

Global BU incidence rate in the study area was 1.25 cases/1,000py over a time period of 10 years and 5 months. Incidence per village ranged from 0, in 59 villages, to 10.4 cases/1,000py, and median incidence was 0.4 cases/1,000py (Interquartile Range = [0–1.1]). A map of cumulative incidence rate over the time-aggregated series is presented in Figure 1A. Cumulative incidence appeared to be highest in villages close to the Nyong River, east of Akonolinga town. There was a significant global aggregation of cases (Moran's $I = 0.349$, $p < 10^{-6}$). The SPODT algorithm identified that the highest risk zone was centered on the Nyong River upstream of Akonolinga (Figure 1B). A decreasing risk gradient with increasing distance to the Nyong was identified, and the highest risk zone had 67 times higher risk of BU than the lowest risk zone.

### Spatio-temporal variations of BU incidence in Akonolinga district, 2002–2012

The role of the Nyong River as a high risk area, and the decreasing risk gradient away from the river, led us to investigate the temporal variations of BU incidence per village according to their distance to the Nyong (Figure S1 in Supplementary Text S1). By change-point analysis process, we identified four phases corresponding to changes in the disease spatial distribution (Figure 2). In the first phase, corresponding to year 2002, the debuting BU treatment program only recruited cases from Akonolinga town and the neighbouring villages (Phase 1, Figure 2A). In the following phases, recruitment was on the entire district. From being centred on Akonolinga town from 2002 to 2006 (Phase2, Figure 2B), the high incidence area appeared to

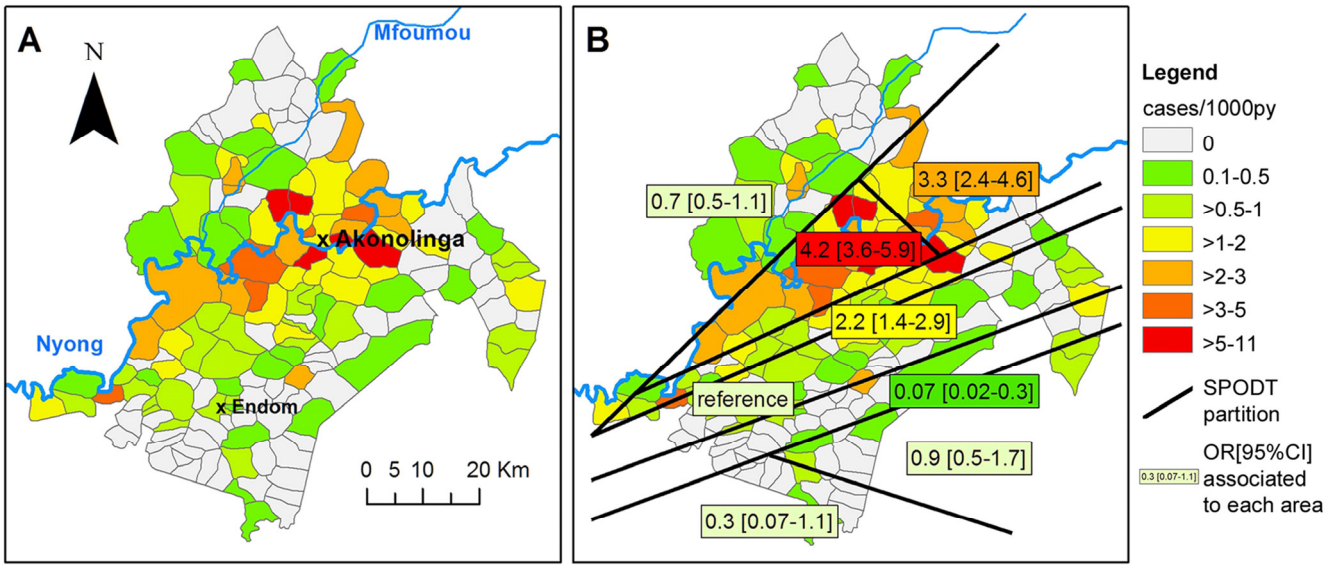



**Figure 1. Identification of the Nyong as a major risk factor for BU incidence in Akonolinga 2002–2012 (spatial analysis on time-aggregated incidence rate of BU in Akonolinga).** A: Incidence rate per village (cases/1,000py). B: Decreasing risk of BU with increasing distance to the Nyong River. Homogenous risk areas of Akonolinga district were identified using the SPODT algorithm. Associated odds-ratio and 95% CI are provided.
doi:10.1371/journal.pntd.0003123.g001

move, first eastward upstream the Nyong in the area of Abem (Phase 3, Figure 2C), then downstream along the Nyong, on the southern part of the river and on the Mfoumou, a tributary of the Nyong (Phase 4, Figure 2D).

## Analysis of local environmental risk-factors for BU in Akonolinga district

**Environment classification in landscape groups.** The unsupervised classification of villages distinguished 7 landscape groups, organised on two main gradients (Table 1 and details in Supplementary Text S1, Figure S2). First, a clear separation was observed between villages with abundant forest cover compared to those where it was greatly reduced, as indicated by EVI values. This separation allowed the definition of a first gradient of increasing human alteration of landscape, based on abundant urban and agricultural land-use, and low proportion of forest cover. Landscape "Urban Nyong" and landscape "Rural Nyong" were characterised by a low forest cover and abundant areas dedicated to agriculture, as well as a high proportion of wetlands. A second gradient separated the villages according to the forest maturity (primary, secondary adult, secondary young) and the proportion of which was mosaicked with cultures. Landscapes "Forest 1" and "Forest 2" had the most abundant forest cover and were generally at a higher altitude with lower proportion of wetlands. "Forest 1" included remnants of dense humid evergreen primary forest, which marks the persistence of undisturbed ecosystems. "Forest 2" included a high proportion of secondary adult forest cover, a fraction of which was cultivated. Landscapes "Cultivated forest" and "Young forest" included intermediate features between these two groups, where young secondary forest, cultivated or not, dominated, indicating a more intense agricultural pressure. Both also presented abundant proportion of wetlands. Finally, landscape "Savannah" corresponded to 2 villages located in a specific area of savannah within the forest. Changes in forest cover, approximated by EVI difference between dry season 2001–02 and 2011–2012 were highest in landscapes "Forest 2" and "Young forest".

**Estimation of landscape-associated risk.** The use of a generalised linear model allowed estimation of BU incidence ratio (IR) from January 2002 to May 2012. Univariate analysis is presented in Table 2. In the landscape model, the highest risk zones corresponded to landscapes "Urban Nyong" and "Rural Nyong" compared to landscape "Forest 1". "Young forest" presented an intermediate risk and all other landscapes did not significantly differ from "Forest 1". In the Nyong River distance model, risk decreased with increasing distance to the river with a dose-response relationship.

For multivariate analysis, we combined Nyong distance and landscape and split landscape "Cultivated forest" according to the location of villages within or beyond the influence range of the Nyong, i.e. "Cultivated forest, ≤10 km from Nyong" and "Cultivated forest, >10 km from Nyong". All other landscapes were located within a single Nyong distance class or did not present significant differences in IR between the two distance classes. The resulting model (Table 3 and figure 3A) indicated that "Urban Nyong" and "Rural Nyong" had the highest risk, respectively IR = 15.7 (95%CI = [4.2–59.2]) and IR = 12.5 (95%CI = [3.7–42.8]) compared to landscape "Forest 1". Landscapes "Young forest" and "Cultivated forest ≤10 km from Nyong" had intermediate risk, respectively IR = 7.9 (95%CI = [2.2–28.8]) and IR = 4.9 (95%CI = [1.4–17.4]). Finally, risk for landscapes "Forest 2", "Cultivated forest >10 km from Nyong" and "Savannah" did not significantly differ from the "Forest 1" landscape. This model explained 41% of the variance between the villages. We performed a further analysis on the model residuals, and found that their spatial distribution presented no remaining spatial autocorrelation (Moran's I = 0.021, p = 0.65). This indicated that our model was able to capture most of the spatial pattern between the villages. Predicted incidence rate and actual cumulative incidence rate maps are presented in Figure 3B and 3C.

**Temporal variations of BU incidence in each landscape.** We studied the series of monthly incident cases for each landscape in order to characterise the temporal variations of

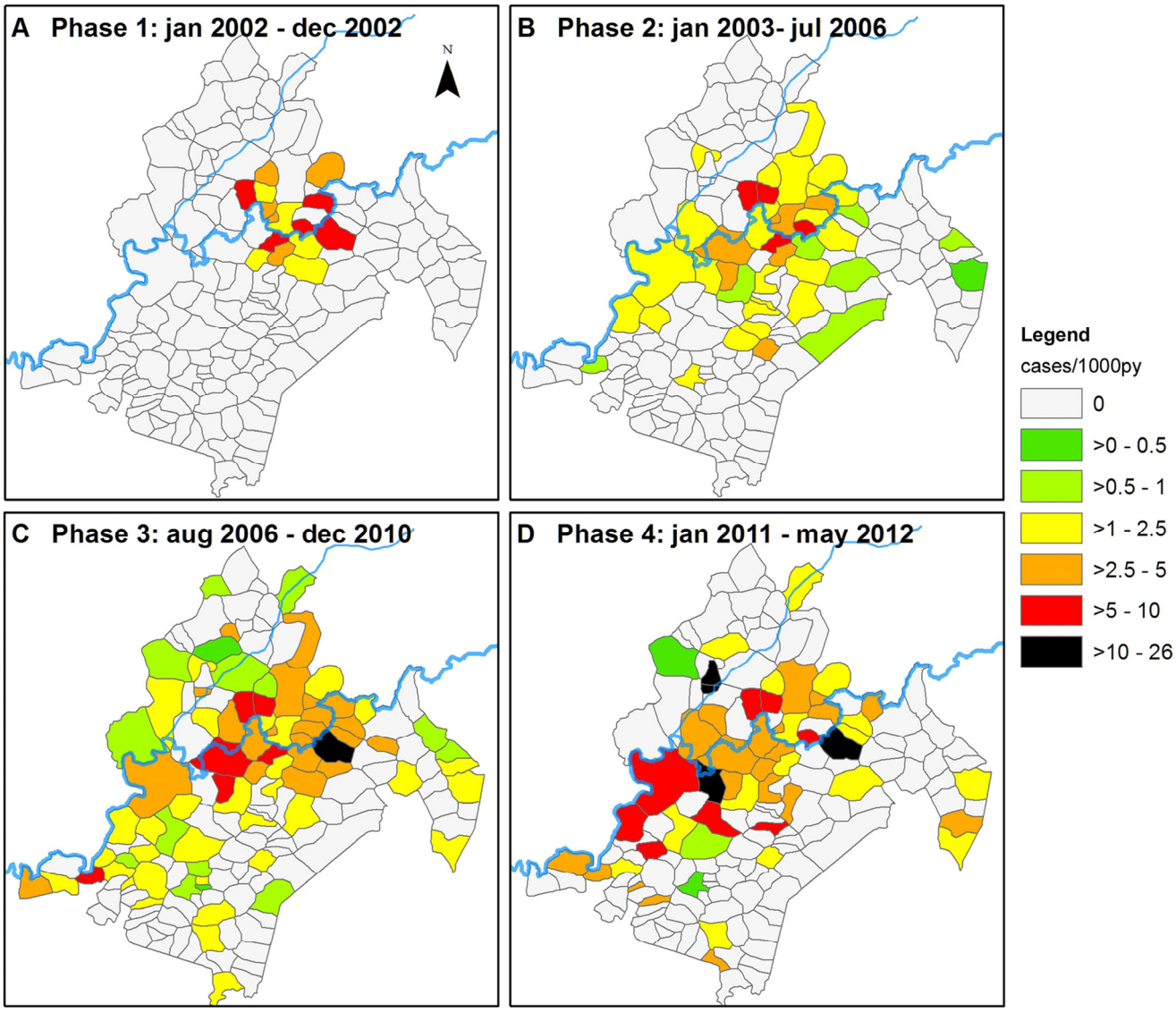



**Figure 2. Maps of spatio-temporal variations of BU incidence in Akonolinga district.** A–D: Incidence rate maps for the periods, phases 1 to 4, identified in the time-series (cases/1,000py).
doi:10.1371/journal.pntd.0003123.g002

BU incidence within the different landscapes (Supplementary Text S1, Figure S3). Landscape "Forest 1" presented only 4 cases during the study period (incidence of 0.2 cases/1,000py) and "Savannah" only 3 cases (0.5 cases/1,000py). Landscapes "Urban Nyong", "Rural Nyong", and "Forest 2" presented stable incidence rates over the study period, averaging respectively 2.1, 2.4 and 0.4 cases/1,000py. Finally, incidence was increasing in landscapes "Cultivated forest" and "Young forest". "Cultivated forest ≤10 km from Nyong" even presented an exponentially increasing incidence rate ($R^2 = 0.97$ for exponential fit compared to $R^2 = 0.87$ for linear fit).

## Discussion

Our study relied on the analysis of 787 BU cases over 125 months of follow-up, which to our knowledge is amongst the highest reported incidences in an endemic region with more than 10 years of continuous follow-up [28,44]. We analysed BU spatio-temporal patterns and were able to reveal local-scale environmental determinants of BU incidence. We demonstrated that the Nyong River represented a major risk factor for BU, in conformity with previous studies of individual risk factors [30] and environmental MU detection [36,45]. We also identified different levels of risk along the river, which were associated to different environment profiles. We suggest that BU risk further increases with abundance of wetlands and with human modifications of landscape, such as cultivation and forest clearing. We also identified stable endemic areas and zones where incidence appears to be rising.

This work benefited from several methodological improvements compared to previous studies. By using the SPODT algorithm for identification of risk zones, we obtained a more accurate description than other studies [21], showing a decreasing risk gradient away from the Nyong River. By considering different categories of forest cover and management, cultivated and uncultivated wetlands, we accounted for local heterogeneities which would have been missed in broader analyses. Contrary to previous studies, which considered forest as a homogeneous

**Table 1.** Selected environment characteristics of landscape groups defined in Akonolinga district.

| Landscape | Major features* | Mean EVI in December* | EVI decrease 2001–12* | Area with WI>18* | Forested Wetland* | Cultivated Wetland* | N villages | Total Population | Main watershed |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Savannah** | Savannah (81%) | 0,367 | 0,049 | 6% | 0 | 0 | 2 | 538 | Nyong |
| **Urban Nyong** | Young cultivated secondary forest (29%), Urban (5%), and cultivated land (9%) | 0,381 | 0,047 | 37% | 7% | 8% | 7 | 17813 | Nyong |
| **Rural Nyong** | Young cultivated secondary forest (25%) | 0,392 | 0,062 | 20% | 5% | 3% | 20 | 6656 | Nyong |
| **Cultivated Forest <10 km Nyong** | Young cultivated secondary forest (37%) | 0,417 | 0,039 | 6% | 10% | 3% | 16 | 5015 | Nyong |
| **Cultivated Forest >10 km Nyong** | Young cultivated secondary forest (39%) | 0,416 | 0,026 | 7% | 10% | 2% | 31 | 8529 | Dja |
| **Young Forest** | Young secondary forest (38%) | 0,417 | 0,074 | 5% | 9% | + | 12 | 3069 | Nyong |
| **Forest 2** | Adult secondary forest (50%) | 0,415 | 0,076 | 5% | 0 | + | 58 | 16729 | Nyong |
| **Forest 1** | Adult secondary forest (48%) and Primary forest (18%) | 0,420 | 0,068 | 4% | + | + | 8 | 1839 | Dja |

*median value for each landscape group; + present, <1%.

doi:10.1371/journal.pntd.0003123.t001

**Table 2.** Univariate analysis.

| | | IRR[1] | [95%CI][2] | p-value |
|---|---|---|---|---|
| **Landscape group** | Urban Nyong | 15.8 | 4.05–61.32 | <0.001 |
| | Rural Nyong | 12.6 | 3.6–44.0 | <0.001 |
| | Savannah | 5.4 | 0.8–36.4 | 0.081 |
| | Cultivated Forest | 2.8 | 0.8–9.5 | 0.106 |
| | Young forest | 7.9 | 2.1–29.6 | 0.002 |
| | Forest 2 | 2.0 | 0.6–6.7 | 0.287 |
| | Forest 1 | 1 | reference | |
| **Distance to the Nyong** | ≤5 km | 7.5 | 4.3–13.5 | <0.001 |
| | >5 and ≤10 km | 2.3 | 1.2–4.3 | 0.01 |
| | >10 and ≤20 km | 1.2 | 0.7–2.2 | 0.528 |
| | >20 km | 1 | reference | |

Incidence rate ratios estimated for the landscape groups and the distance to the Nyong River in 154 villages of Akonolinga district, Cameroon, 2002–2012.
[1]IRR: Incidence Rate ratio.
[2][95%CI]: 95% confidence interval.
doi:10.1371/journal.pntd.0003123.t002

category [21,23,28] and found it a risk factor, we used a detailed LULC classification, ground-truthed, and a small buffer radius (5 km instead of 20 km). We demonstrated that the different forest categories presented different risk levels according to their status regarding human activities, and that BU risk followed a dose-response relationship according to forest degradation [5,46].

Our study showed that BU incidence spatio-temporal patterns are complex, but might be explained for a large part by landscape characteristics and heterogeneities. We identified the Nyong River as a major driver of BU incidence in the Akonolinga region, and local scale environmental variations in the landscapes along the river were associated to significantly different risk levels.

These variations, distinguishing between landscapes at high and intermediate BU-risk were principally the proportion of wetlands, and the type and extent of forest cover. The proportion of wetlands was evaluated topographically (% surface with TWI>18) or in LULC descriptions, where cultivated wetlands occupied a larger surface in high-risk landscapes ("Rural Nyong" and "Urban Nyong") and forested wetlands in intermediate-risk landscapes ("Young forest" and "Cultivated forest"). The type and extent of forest cover reflected the level of human modifications. In the highest-risk landscapes, forest cover was reduced and corresponded mainly to cultivated young secondary forest. These landscapes, located in the densely populated part of the district, are shaped by intense agricultural pressure, as indicated also by the proportion of cultivated lands, including wetlands. The intermediate-risk landscapes near the Nyong River, "Cultivated forest <10 km from the Nyong River" and "Young forest", were less modified by human activities and retained important forest covers. The observed increase in incidence during the study period could result from recent environmental modifications: using only a crude measurement, we showed that "Young forest" is one of the landscapes with the largest decrease in EVI, indicating a decrease in forest cover. These areas of increasing incidence are located downstream from the floodplain of the town of Akonolinga. Speculatively, MU could have spread along the Nyong colonising new environments.

The landscapes at lowest risk, "Forest 1", "Forest 2" and "Cultivated forest >10 km from Nyong River", were mainly composed of villages located far from the Nyong River and corresponding to the most preserved environments. In "Forest 1" landscape, BU incidence was about 100 times lower than in highest risk areas, while it was only about 50 times lower in "Forest

**Table 3.** Incidence rate ratios estimated for the landscape groups combined with Nyong River distance in 154 villages of Akonolinga health district, Cameroon, 2002–2012.

| Landscape group | IRR[1] | [95%CI][2] | p-value |
|---|---|---|---|
| Urban Nyong | 15.7 | 4.2–59.4 | <0.001 |
| Rural Nyong | 12.5 | 3.7–42.9 | <0.001 |
| Savannah | 5.4 | 0.8–34.2 | 0.077 |
| Cultivated forest; ≤10 km to Nyong | 4.9 | 1.4–17.4 | 0.014 |
| Cultivated forest; >10 km to Nyong | 1.6 | 0.4–5.5 | 0.499 |
| Young forest | 7.9 | 2.2–28.9 | 0.002 |
| Forest 2 | 2.0 | 0.6–6.6 | 0.277 |
| Forest 1 | 1 | reference | |

Deviance explained: 41%; Akaike Information Criterion: 578.4.
[1]IRR: Incidence Rate ratio.
[2][95%CI]: 95% confidence interval.
doi:10.1371/journal.pntd.0003123.t003

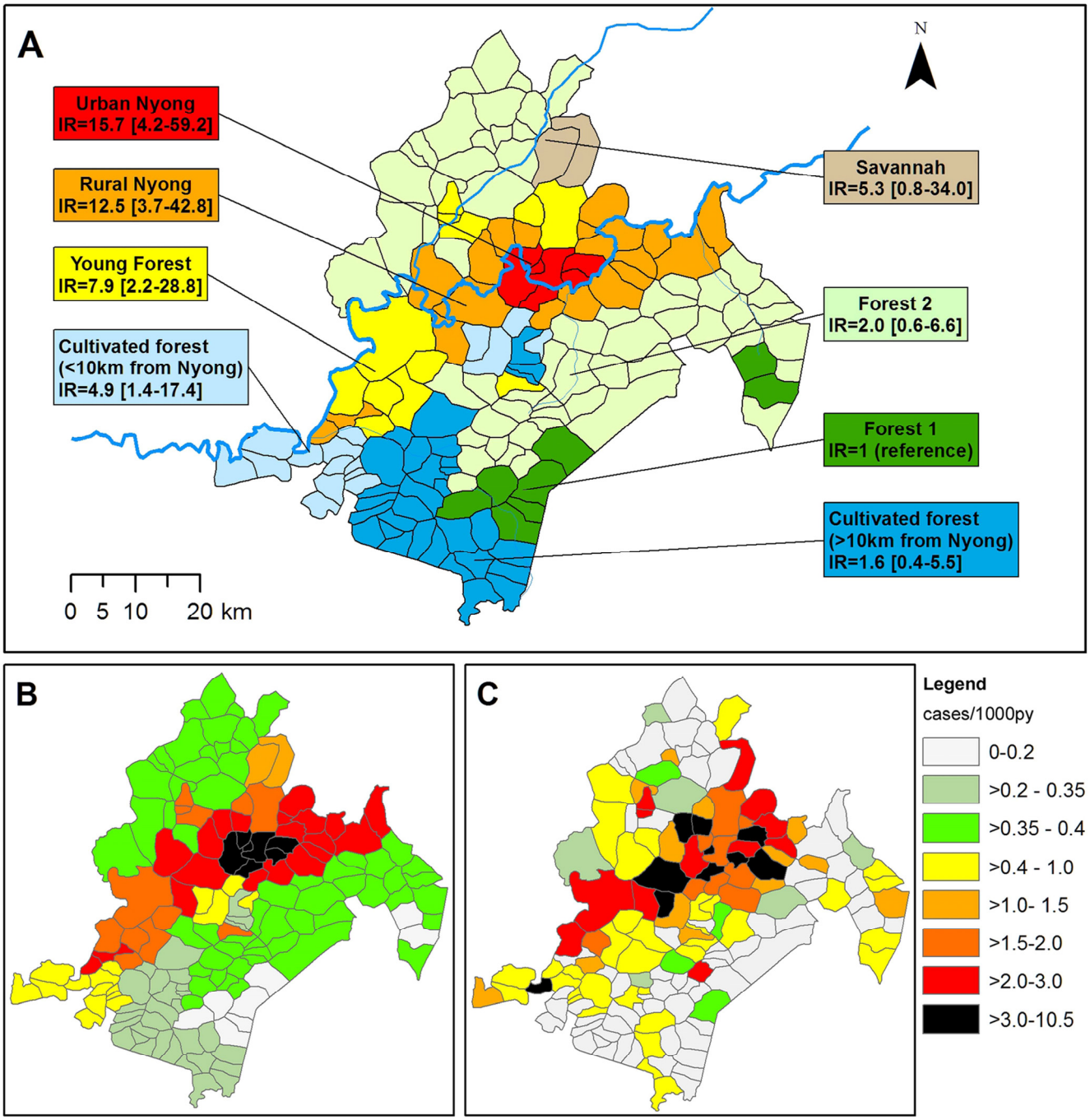



**Figure 3. Landscape-associated risk of BU in Akonolinga district, 2002–2012.** A: Classification of Akonolinga area villages according to landscape group and associated BU incidence ratio with 95% confidence interval. B: Predicted cumulative incidence for each village of the district according to the landscape model (cases/1,000py). C: Observed cumulative incidence rate for each village of the district (cases/1,000py).
doi:10.1371/journal.pntd.0003123.g003

2" landscape. Even if not significant, we observed the same trend of BU risk increase with increasing forest degradation level.

We can propose that spatial variations of BU incidence in Akonolinga Health District resulted from the superimposition of two main factors: a high or low baseline risk related to the Nyong River proximity, and additional risks related to wetland abundance and environmental modifications by human activities. The role of the wetlands was supported by analyses of MU presence in Akonolinga water bodies, which showed that wetlands acted as a permanent reservoir of MU over the year, while other water bodies presented season-specific peaks of MU colonisation [45]. The increase in BU risk associated with human modifications of the environment could result from contact with newly accessible but pre-existing high-risk environments, from an increase in the number of contacts with risk sources due to populations increasing their activity range, or from the transformation of natural

environments into high-risk sources by human activities (such as clearing wetlands for cultivation) [47]. The contribution of each phenomenon could be evaluated using chronological descriptions of the environment evolution, as well as of human practices.

The main limitation of this work was that it relied on "semi-active" case detection. We analysed data from cases which were diagnosed and treated at Akonolinga district hospital. They may not represent all the cases that occurred in the Akonolinga health district over the study period, since patients tend to seek traditional treatments as a first option [48]. However, since BU is a slowly progressing disease and difficult to cure even in hospitals, cases are likely to seek medical care at some point, eventually after failure of traditional treatment [48]. We analysed the spatial incidence trends over large periods of time, which probably allowed us to capture a large proportion of the incident cases over the study period, even patients with long delay to diagnosis. In addition, we cannot be sure that cases were infected in a given location, but given the activity patterns and our study scale, we can be confident that our work focuses on the main environments frequented by the populations.

This series of cases originated from a single treatment centre with a defined population-catchment area. The BU program in Akonolinga district has established a dynamic network of community correspondents in the villages, who contribute to population information and awareness, as well as case detection. Regular investigations are also performed in the area by medical staff and social workers in order to examine suspect cases and advocate for hospital treatment in a context where traditional treatment is generally the first option, despite free treatments [46]. This coverage ensured that a maximum number of incident cases were detected, diagnosed and treated, and therefore included in this analysis. Comparisons with previous data from cross-sectional surveys in Akonolinga region support our assumption that cases treated at Akonolinga hospital are representative of cases occurring in the Akonolinga district [17,18] and support our description of localised increases in incidence.

Our results are consistent with previous results regarding individual risk factors. In a case-control study from 2006, wading in the Nyong swamps and not wearing long protective clothing while farming were identified as risk factors [30]. We showed that BU is associated to agricultural areas near the Nyong and suggested that the clearing and cultivation of swamps could have contributed to risk increase at the population level. This hypothesis was supported by interviews performed during an anthropologic study in Ekougou and Abem, two villages located near the Nyong flood plain in "Rural Nyong" landscape. The informants related BU to the practice of clearing swamps for vegetable cultivation, which started about 20–25 years ago in the flood plain near Akonolinga [37]. It would be interesting to document if these practices occur in landscapes with increasing incidence, and when they started. The informants also incriminated large bushfires in the 1980s, which deeply modified the ecosystem of the Nyong floodplain [37]. The increase in population could also explain a new need for land in more remote areas of the district, triggering deforestation and BU.

## Conclusion

The present work provides a quantitative assessment of the link between BU, slow flowing rivers, like the Nyong River, landscape features and their modifications by human activities. We clarify the role of forest, previously considered as a risk factor, by distinguishing pristine from human-perturbed ecosystems. We also underline major heterogeneities within Akonolinga endemic area, which presents stable high and low endemic zones, and zones with a rising incidence rate. Further studies regarding environment sampling for MU detection in endemic areas, or identification of risk-factors should take into account that environments at risk are defined at a very local scale. Surveillance of BU and active case search programs in endemic regions should also include the fact that BU geography can be substantially modified on a short time span, endangering new populations.

## Supporting Information

**Checklist S1 STROBE checklist.**
(DOC)

**Text S1 Supporting figures and detailed legends.** Includes: Figure S1: Space-time analysis of BU incidence in Akonolinga. Figure S2: Principal components analysis and selected results. Figure S3: Cumulative incidence graphs in 6 Akonolinga landscapes, 2002–2012.
(PDF)

## Acknowledgments

The authors would like to thank Tamara Giles-Vernick for sharing her understanding of population practices in Akonolinga, Juliette Paireau for numerous tips using R and ArcGIS, Benjamin Roche and Romulus Breban for useful insights on data analysis, Joachim Etouna (Institut National de Cartographie du Cameroun), Minia Valère (BUCREP) who contributed population and administrative data, Hervé Chevillotte (IRD Cameroon), for environmental data from the IFORA project (ANR-Biodiv grant IFORA), the partner teams of the EXTRA-MU project, the Mycobacteriology Service staff at Centre Pasteur du Cameroun who performed diagnosis confirmation, and Drs Gervais Folefack and Michaël Tsoungui at Akonolinga district hospital and their staff.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JL JG GT KC JFG AF. Performed the experiments: JL GT KC. Analyzed the data: JL JG KC GT DLS. Contributed reagents/materials/analysis tools: SE DLS. Contributed to the writing of the manuscript: JL JG KC JFG DLS SE AF GT.

## References

1. Silva MT, Portaels F, Pedrosa J (2009) Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite *Mycobacterium ulcerans* leading to Buruli ulcer. Lancet Infect Dis 9: 699–710. doi:10.1016/S1473-3099(09)70234-8.
2. Wansbrough-Jones M, Phillips R (2006) Buruli ulcer: emerging from obscurity. Lancet 367: 1849–1858. doi:10.1016/S0140-6736(06)68807-7.
3. 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.
4. World Health Organisation - Global Buruli Ulcer Initiative Meeting (2012) Buruli ulcer control and research: Summary Data. Available: http://www.who.int/buruli/Summary_data_and_new_target_2013.pdf. Accessed 12 December 2013.
5. Merritt RW, Walker ED, Small PLC, Wallace JR, Johnson PDR, et al. (2010) Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. PLoS Negl Trop Dis 4: e911. doi:10.1371/journal.pntd.0000911.
6. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, et al. (2007) Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. Genome Res 17: 192–200. doi:10.1101/gr.5942807.
7. Doig KD, Holt KE, Fyfe JAM, Lavender CJ, Eddyani M, et al. (2012) On the origin of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. BMC Genomics 13: 258. doi:10.1186/1471-2164-13-258.
8. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres a, Fonteyne P a, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. Lancet 353: 986. doi:10.1016/S0140-6736(98)05177-0.
9. Johnson PDR, Azuolas J, Lavender CJ, Wishart E, Stinear TP, et al. (2007) *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. Emerg Infect Dis 13: 1653–1660. doi:10.3201/eid1311.061369.

10. Fyfe JAM, Lavender CJ, Handasyde KA, Legione AR, O'Brien CR, et al. (2010) A major role for mammals in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*. PLoS Negl Trop Dis 4: e791. doi:10.1371/journal.pntd.0000791.
11. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Andre J . Saint, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol 68: 4623–4628. doi:10.1128/AEM.68.9.4623.
12. Lambin EF, Tran A, Vanwambeke SO, Linard C, Soti V (2010) Pathogenic landscapes: interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts. Int J Health Geogr 9: 54. doi:10.1186/1476-072X-9-54.
13. Faucher B, Gaudart J, Faraut F, Pomares C, Mary C, et al. (2012) Heterogeneity of environments associated with transmission of visceral leishmaniasis in South-Eastern France and implication for control strategies. PLoS Negl Trop Dis 6: e1765. doi:10.1371/journal.pntd.0001765.
14. Um Boock A, Wiss K, Eyangoh S (2005) [Preliminary national survey on Buruli ulcer in Cameroon]. Bull l'ALLF: 41–42.
15. Uganda Buruli Group (1971) Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda. Trans R Soc Trop Med Hyg 65: 763–775.
16. Barker DJ (1972) The distribution of Buruli disease in Uganda. Trans R Soc Trop Med Hyg 66: 867–874.
17. 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.
18. Porten K, Sailor K, Comte E, Njikap A, Sobry A, et al. (2009) Prevalence of Buruli ulcer in Akonolinga health district, Cameroon: results of a cross sectional survey. PLoS Negl Trop Dis 3: e466. doi:10.1371/journal.pntd.0000466.
19. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, et al. (2011) Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon. Emerg Infect Dis 17: 551–553. doi:10.3201/eid1703091859.
20. Phanzu DM, Suykerbuyk P, Saunderson P, Ngwala Lukanu P, Masamba Minuku J-B, et al. (2013) Burden of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) and the underreporting ratio in the territory of Songololo, Democratic Republic of Congo. PLoS Negl Trop Dis 7: e2563. doi:10.1371/journal.pntd.0002563.
21. Wagner T, Benbow ME, Brenden TO, Qi J, Johnson RC (2008) Buruli ulcer disease prevalence in Benin, West Africa: associations with land use/cover and the identification of disease clusters. Int J Health Geogr 7: 25. doi:10.1186/1476-072X-7-25.
22. Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh CR, 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.
23. Brou T, Broutin H, Elguero E, Asse H, Guegan J-F (2008) Landscape diversity related to Buruli ulcer disease in Côte d'Ivoire. PLoS Negl Trop Dis 2: e271. doi:10.1371/journal.pntd.0000271.
24. Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, Okrah J, Asamoa K, et al. (2002) Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. Emerg Infect Dis 8: 167–170. doi:10.3201/eid0802.010119.
25. Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, Beachboard DC, Kimbirauskas RK, et al. (2008) Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. PLoS Negl Trop Dis 2: e205. doi:10.1371/journal.pntd.0000205.
26. Wagner T, Benbow ME, Burns M, Johnson RC, Merritt RW, et al. (2008) A Landscape-based model for predicting *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer disease) presence in Benin, West Africa. Ecohealth 5: 69–79. doi:10.1007/s10393-007-0148-7.
27. Sopoh GE, Johnson RC, Anagonou SY, Barogui YT, Dossou AD, et al. (2011) Buruli ulcer prevalence and altitude, Benin. Emerg Infect Dis 17: 153–154. doi:10.3201/eid1701.100644.
28. Van Ravensway J, Benbow ME, Tsonis AA, Pierce SJ, Campbell LP, et al. (2012) Climate and landscape factors associated with Buruli ulcer incidence in Victoria, Australia. PLoS One 7: e51074. doi:10.1371/journal.pone.0051074.
29. 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.
30. 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: e101. doi:10.1371/journal.pntd.0000101.
31. World Health Organization, Portaels F (2014) Laboratory diagnosis of Buruli ulcer. World Health Organization.
32. Fyfe JAM, Lavender CJ, Johnson PDR, Globan M, Sievers A, et al. (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. doi:10.1128/AEM.02971-06.
33. Mensah-Quainoo E, Yeboah-Manu D, Asebi C, Patafuor F, Ofori-Adjei D, et al. (2008) Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) at a treatment centre in Ghana: a retrospective analysis of laboratory results of clinically diagnosed cases. Trop Med Int Health 13: 191–198. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01990.x.
34. Laburthe-Tolra P (1981) Les seigneurs de la forêt. Les seigneurs de la forêt. Essai sur le passé historique, l'organisation sociale et les normes éthiques des anciens Beti du Cameroun. Paris: L'Harmattan.
35. Guyer J (1984) Family and farm in Southern Cameroon. Boston: Boston University African Studies Center.
36. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, et al. (2010) Seasonal and regional dynamics of *M. ulcerans* transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors. PLoS Negl Trop Dis 4: e731.
37. Giles-Vernick T, Owona-Ntsama J, Landier J, Eyangoh S (2014) The puzzle of Buruli ulcer transmission, ethno-ecological history and the end of "love" in the Akonolinga district, Cameroon. Soc Sci Med. doi:10.1016/j.socscimed.2014.03.008.
38. Gond V, Fayolle A, Pennec A, Cornu G, Mayaux P, et al. (2013) Vegetation structure and greenness in Central Africa from Modis multi-temporal data. Philos Trans R Soc B 368: 20120309.
39. Huete AR, Didan K, Shimabukuro YE, Ratana P, Saleska SR, et al. (2006) Amazon rainforests green-up with sunlight in dry season. Geophys Res Lett 33: L06405. doi:10.1029/2005GL025583.
40. World Resources Institute (2013) Interactive Forest Atlas of Cameroon (version 3.0).
41. Gaudart J, Giorgi R, Poudiougou B, Touré O, Ranque S, et al. (2007) [Spatial cluster detection without point source specification: the use of five methods and comparison of their results]. Rev Epidemiol Sante Publique 55: 297–306. doi:10.1016/j.respe.2007.04.003.
42. Gaudart J, Poudiougou B, Ranque S, Doumbo O (2005) Oblique decision trees for spatial pattern detection: optimal algorithm and application to malaria risk. BMC Med Res Methodol 5: 22. doi:10.1186/1471-2288-5-22.
43. Erdman C, Emerson JW (2007) bcp: An R package for performing a Bayesian analysis of Change Point problems. J Stat Softw 23: 1–13.
44. Morris A, Gozlan R, Marion E, Marsollier L, Andreou D, et al. (2014) First detection of *Mycobacterium ulcerans* DNA in environmental samples from South America. PLoS Negl Trop Dis 8: e2660. doi:10.1371/journal.pntd.0002660.
45. Garchitorena A, Roche B, Kamgang R, Ossomba J, Babonneau J, et al. (2014) *Mycobacterium ulcerans* ecological dynamics and its association with freshwater ecosystems and aquatic communities: results from a 12-month environmental survey in Cameroon. PLoS Negl Trop Dis 8: e2879. doi:10.1371/journal.pntd.0002879.
46. Hill AB (1965) The environment and disease: association or causation? Proc R Soc Med 58: 295–300.
47. Kilpatrick AM, Randolph SE (2012) Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. Lancet 380: 1946–1955. doi:10.1016/S0140-6736(12)61151-9.
48. Peeters Grietens K, Toomer E, Um Boock A, Hausmann-Muela S, Peeters H, et al. (2012) What role do traditional beliefs play in treatment seeking and delay for Buruli ulcer disease?–insights from a mixed methods study in Cameroon. PLoS One 7: e36954. doi:10.1371/journal.pone.0036954.

## Supplementary text S1: Supporting Figures & detailed legends

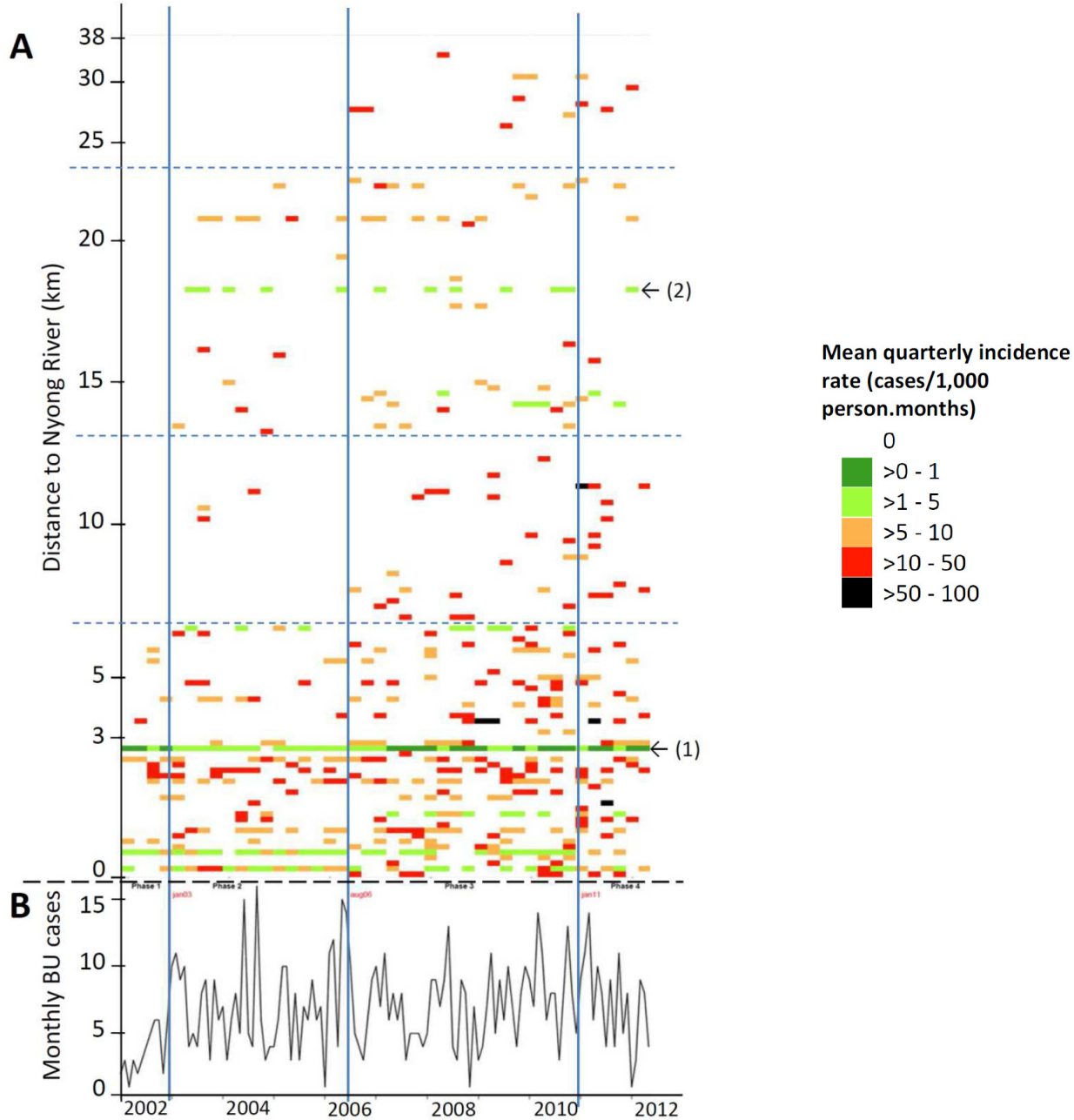



**Figure S1: Space-time analysis of BU incidence in Akonolinga.**

**A:** Identification of time-space patterns of BU incidence in Akonolinga on a heatmap of trimestrial BU incidence rate in the different villages of Akonolinga district 2002-2012.

Villages are ordered according to their distance to the Nyong, each village is represented by a horizontal bar of different colours. Each vertical bar represents a quarter year and the colour is proportional to the incidence. White corresponds to 0 incidence. The vertical solid lines indicate the different phases identified and horizontal dotted lines the different spatial zones.

Phase 1: The year 2002 corresponded to the beginning of the BU treatment program which was limited to Akonolinga town and its surroundings. From 2003, the program was covering the whole district (see S1B).

Phase 2: In the period from 2003-2006, villages within 0-7km from the river show incident cases. Sporadic cases also occurred in the 13-23km band.

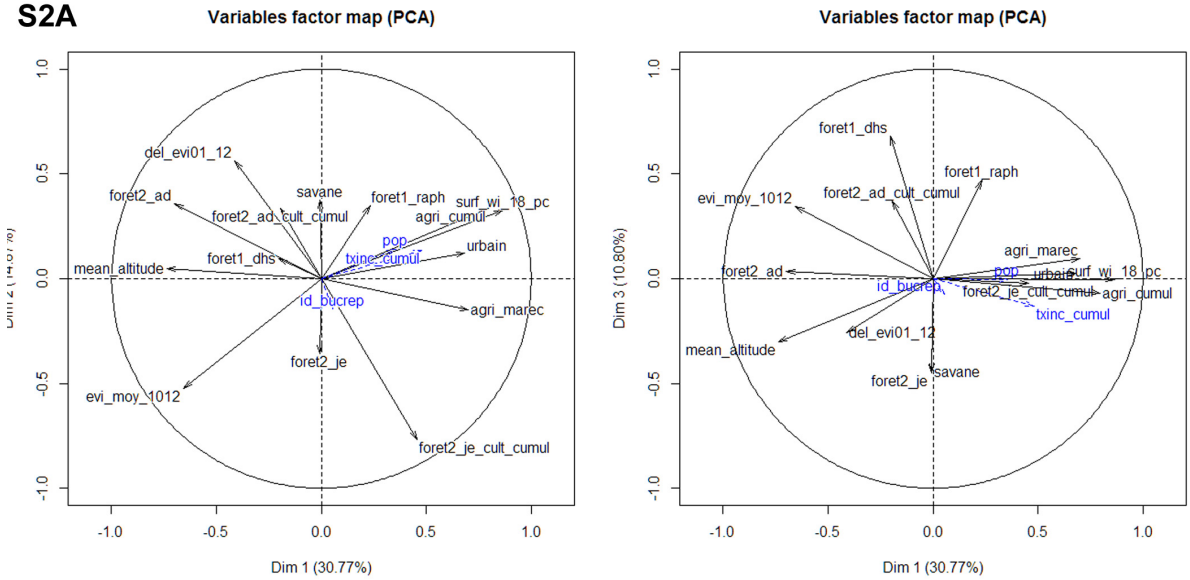
Phase 3: From August 2006, an increase in incidence was observed in the villages located from 7 to 13km from the Nyong. Cases also started to be detected more than 23km away from the Nyong.

Phase 4: From January 2011 on, a decreasing trend was observed in the general incidence (see S1B).

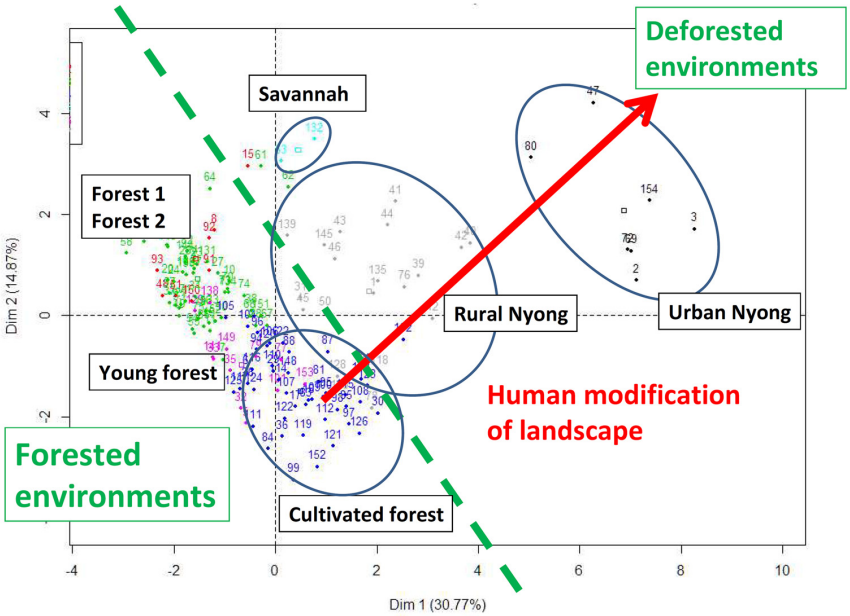
(1) Akonolinga town (n=13,381 inhabitants), (2) Endom town (n=1,586)

**B:** Monthy time series of BU cases (raw data) in Akonolinga district from 2002 to 2012.

**S2A**


Variables factor map (PCA)
del_evi01_12
foret2_ad
savane
foret1_raph
surf_wi_18_pc
foret2_ad_cult_cumul
agri_cumul
pop
urbain
mean_altitude
foret1_dhs
txinc_cumul
id_bucrep
agri_marec
foret2_je
evi_moy_1012
foret2_je_cult_cumul
Dim 1 (30.77%)
Variables factor map (PCA)
foret1_dhs
foret1_raph
evi_moy_1012
foret2_ad_cult_cumul
agri_marec
foret2_ad
pop
urbain
surf_wi_18_pc
id_bucrep
foret2_je_cult_cumul
agri_cumul
txinc_cumul
del_evi01_12
mean_altitude
foret2_je
savane
Dim 3 (10.80%)
Dim 1 (30.77%)

**S2B**


Deforested environments
Savannah
Forest 1
Forest 2
Rural Nyong
Urban Nyong
Young forest
Human modification of landscape
Forested environments
Cultivated forest
Dim 2 (14.87%)
Dim 1 (30.77%)

**S2C**

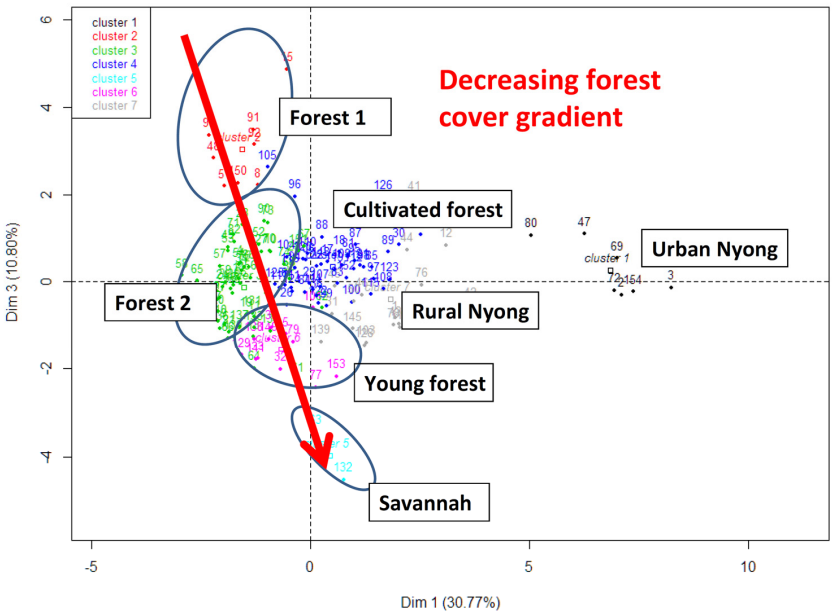

cluster 1
cluster 2
cluster 3
cluster 4
cluster 5
cluster 6
cluster 7
Decreasing forest cover gradient
Forest 1
Cultivated forest
Urban Nyong
Forest 2
Rural Nyong
Young forest
Savannah
Dim 3 (10.80%)
Dim 1 (30.77%)

**Figure S2: Principal components analysis and selected results.**

The following variables were introduced in the principal components analysis:

- Environment= % of buffer surface occupied by: urban, agriculture, wetlands, cultivated wetlands, savannah, primary forest (dense humid evergreen), forest with raffia trees, adult secondary forest, cultivated adult secondary forest, young secondary forest, cultivated young secondary forest
- Topography= altitude, % of buffer surface with a topographic wetness index >18 (wetland).
- Summary vegetation measurements= Mean EVI in December, Difference in EVI between dry season 2001-02 and 2011-2012.

**S2A: Correlations circle, showing the contributions of the various variables to the 3 first principal components**

Principal components analysis consists into obtaining new variables, the principal components, which contain the largest part of the information contained in the original variables, but summarised and combined with each other. On the circle, each original variable is represented as an arrow. Its direction indicates to which principal component it contributes most, and its length corresponds to the weight it contributed to the component.

For example, variable "urban" contributes positively to the first principal component (horizontal, directed to the right). "agri_marec", corresponding to cultivated wetlands proportion, also has a similar direction. On the contrary, "mean_altitude" contributes negatively to the first component. This indicates that, in Akonolinga district, villages with a high urban variable also have a high proportion of cultivated wetlands, but not a high altitude. These villages correspond to the "Akonolinga urban" landscape and are located on the right of figure S2B. The villages with a higher altitude, and also low urban and cultivated wetlands, are found on the left ("Forest 1" and "Forest 2"). Overall the two first components explain 45.64% of the total variance, and the first and third components 41.57 per cent of the total variance.

**S2B: Representation of villages according to their coordinates on the first and second components coloured according to the landscape group.**

**S2C: Representation of villages according to their coordinates on the first and third components coloured according to the landscape group.**

The representations in S2B and S2C show how villages were separated according to their environmental characteristics as indicated by the variables. We indicated the names of groups and the main features separating and grouping the villages: gradients, forest cover…

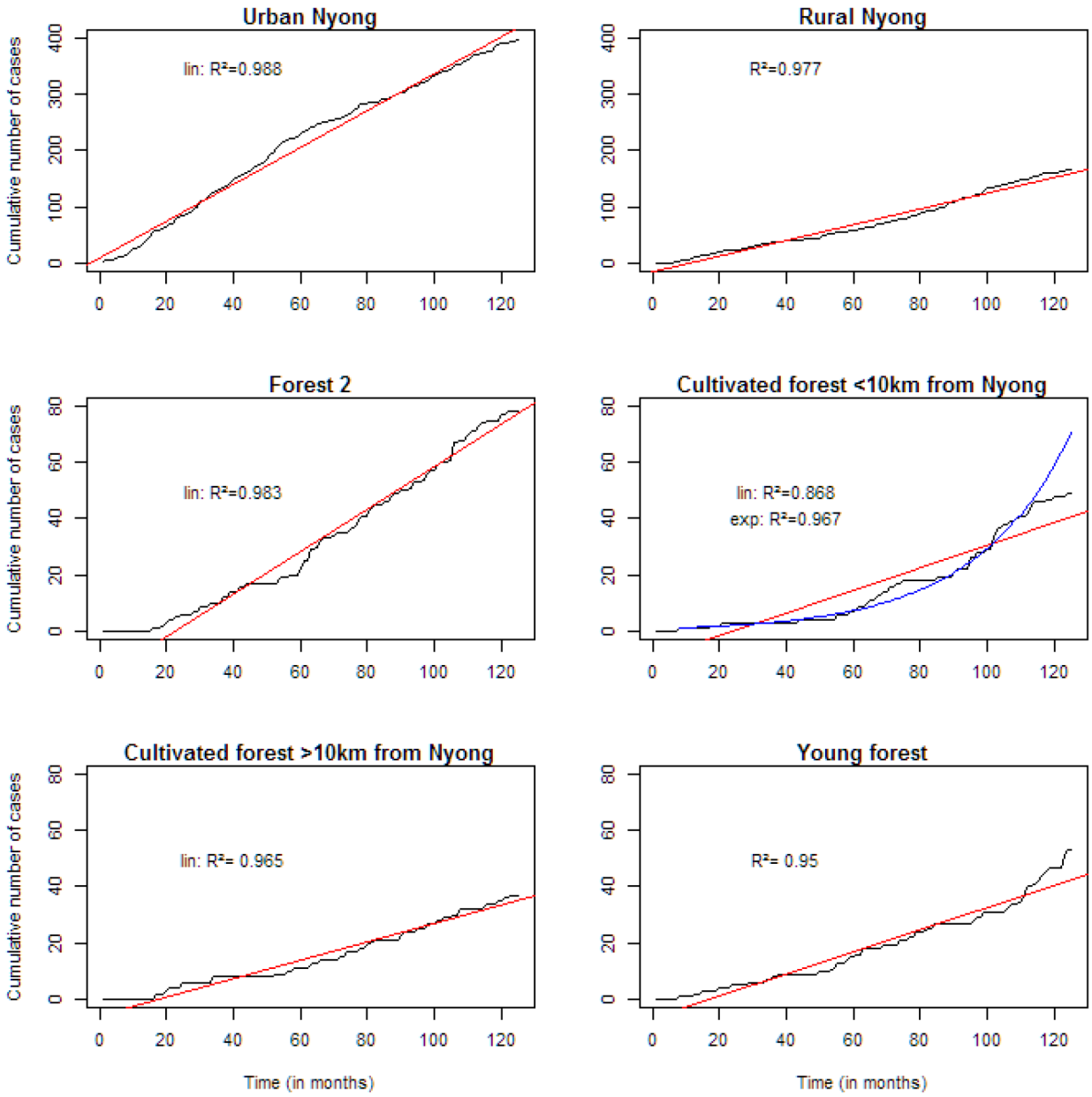


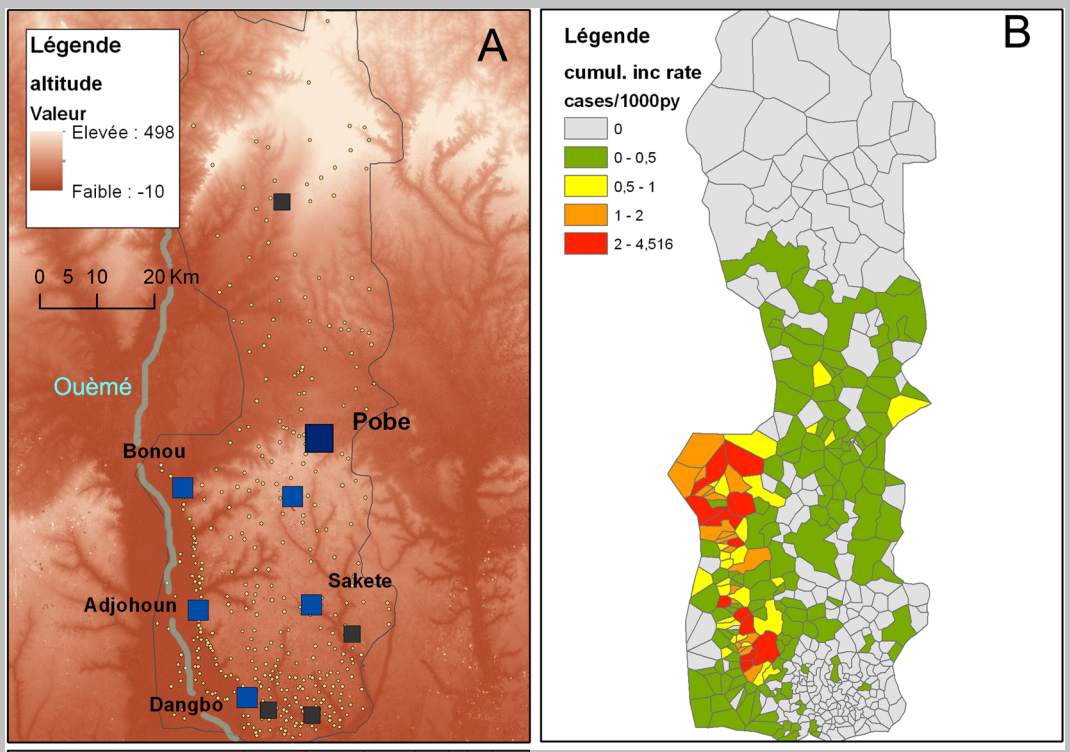

**Figure S3: Cumulative incidence graphs in 6 Akonolinga landscapes, 2002-2012.**

Linear fit is presented for each graph (with $R^2$ value). For landscape "Cultivated Forest, <10km from Nyong", exponential and linear fits are presented with their respective $R^2$.

A good linear fit indicated that the monthly increase in case numbers was stable, and allowed us the calculation of an average incidence rate, over the period, within the landscape. When exponential curve fitted the data better we concluded that incidence was increasing.

**Encadré 3.1: Analyses spatiales de l'incidence de l'UB dans la région de Pobè au Bénin: 2003-2012**

Des travaux sont en cours à partir de données similaires à celles d'Akonolinga et recueillies au CDTUB de Pobè au Bénin [22]. A titre de comparaison, nous présentons ci-dessous les résultats déjà obtenus en termes de distribution spatiale du risque d'UB.



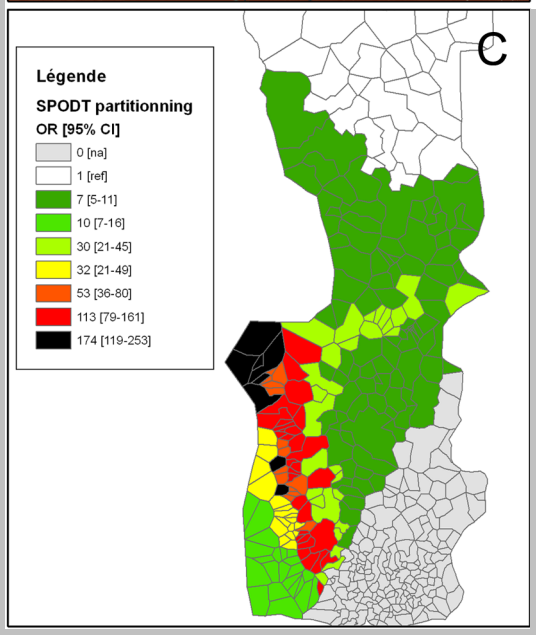




**Figure 3.1 : L'ulcère de Buruli et son émergence dans la région de Bankim.**
A: Relief des départements de Ouèmé et Plateau, bassin de population du CDTUB. B: Incidence cumulative de l'ulcère de Buruli par village, 2003-2012. C: Découpage de la zone d'étude en zone de risque homogène en utilisant l'algorithme SPODT. Le découpage a été obtenu à partir du centre de chaque village, mais représenté sur des polygones de Thissen. Les zones de risque homogène peuvent donc apparaître discontinues.

On observe le même type de gradient de risque avec la proximité du fleuve Ouèmé que pour le fleuve Nyong à Akonolinga, à une échelle spatiale identique. Les villages les plus à risque sont donc situés au bord du fleuve, les deux zones en altitude au Nord et au Sud de Pobè étant peu affectées. On peut distinguer une zone à faible risque au niveau de la ville de Pobè, qui correspond à la zone à altitude intermédiaire entre les deux plateaux. Une corrélation avec l'altitude avait déjà été décrite au Bénin [82]. L'analyse des paysages permettra de mieux comprendre les environnements associés aux différents niveaux de risque identifiés ici.

## 2. Une saison à haut risque pour l'ulcère de Buruli ? Analyse de la cohorte d'Akonolinga à la recherche de variations saisonnières dans l'incidence

L'objectif de ce travail était de vérifier l'existence de variations saisonnières de l'incidence de l'UB en fonction du climat. Ce postulat a été formulé à plusieurs reprises, mais l'argumentation se limitait souvent à la superposition de données d'incidence sur une ou deux années, ou d'incidence moyenne, avec des données de pluviométrie. Il s'agit pourtant d'un élément important à prendre en compte pour déployer sur le terrain des activités de sensibilisation à l'UB et d'éventuels moyens de prévention, ainsi que pour planifier des campagnes de détection précoce des cas.

Il s'agissait donc de proposer une analyse adéquate capable d'améliorer les connaissances disponibles sur cette question d'une saisonnalité et d'identifier des tendances généralisables à d'autres foyers. Nous avons utilisé la série de données d'Akonolinga, présentée plus haut et nous avons restreint l'analyse aux cas incidents survenus dans la zone identifiée à haut risque et à incidence stable (paysages Nyong Urbain et Nyong Rural). Pour étudier cette série d'une durée de dix ans, nous avons fait appel à une technique puissante : l'analyse d'ondelettes. Cette méthode permet de s'affranchir d'un certain nombre de pré-requis aux analyses classiques de séries temporelles, qui ne peuvent pas être vérifiés pour l'ulcère de Buruli.

Notre analyse a permis d'identifier l'existence de variations saisonnières significatives sur une partie de la série, marquées par un pic de cas aux mois de Mars et Avril. Nous avons pu mettre en évidence un décalage de phase de six mois entre ce maximum et le maximum du débit du fleuve Nyong, qui correspond aussi à la grande saison pluvieuse. En mettant en parallèle les données recueillies à Akonolinga sur les activités des populations, le climat, la présence de MU dans l'environnement aquatique, nous faisons l'hypothèse que la saison à haut risque de transmission correspond aux mois d'Août à Octobre, qui se traduit, six mois plus tard, par un pic d'incidence. Ce délai est compatible avec les estimations de temps d'incubation existantes pour l'UB, ainsi qu'avec les délais entre apparition des symptômes et consultations rapportés par les patients d'Akonolinga.

Cet article est en cours de review dans Emerging Infectious Diseases.

# A high-risk season for Buruli ulcer in Africa? Analysis of a ten-year cohort from Cameroon.

Jordi Landier[1,2,3], Guillaume Constantin de Magny[4], Andres Garchitorena[4,5], Jean-François Guégan[4,5], Jean Gaudart[6], Laurent Marsollier[7], Philippe Le Gall[8], Tamara Giles-Vernick[1], Sara Eyangoh[3], Arnaud Fontanet[1,9], Gaëtan Texier[2,6]

[1] Institut Pasteur, Unité de Recherche et d'expertise en Epidémiologie des Maladies Emergentes, Paris, France.

[2] Service d'Epidémiologie et de Santé Publique, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon.

[3] Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon.

[4] UMR MIVEGEC 5290 CNRS - IRD - Université de Montpellier I - Université de Montpellier II, Montpellier, France.

[5] Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes, France.

[6] UMR912-SESSTIM, INSERM - IRD - Aix-Marseille Université, Marseille, France

[7] ATOMycA, Inserm Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS and LUNAM, CHU and Université d'Angers, Angers, France.

[8] Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UR 072 IRD & UPR 9034 CNRS, Gif sur Yvette, France, and Université Paris-Sud 11, Orsay, France.

[9] Chaire Santé et Développement, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France.

Keywords: Buruli ulcer, seasonality, Cameroon, wavelet analysis

Running title: A high-risk season for Buruli ulcer

**Abstract**

Buruli ulcer (BU) is a neglected tropical disease caused by Mycobacterium ulcerans (MU). Little is known about MU transmission, in terms of environments or periods at risk. We investigated seasonal patterns in BU incidence in a series of 562 patients originating from the highly endemic area of Akonolinga, in Cameroon, over a 10-year period. We tested the association of incidence variations with variations in rainfall and Nyong River flow. We identified a statistically significant seasonal signal from 2005 to 2009. The peak of cases occurred in March, six months after the high rainy season when the flooding is maximal. We suggest that the risk of infection is maximal when flooding occurs and MU concentration is high in the environment. Public health campaigns should focus on advising populations to limit their exposure during the high-risk season and intensify active case-detection in the following months to ensure early access to treatment.

## Introduction

Buruli ulcer (BU) is a severe, damaging skin infection caused by *Mycobacterium ulcerans* (MU), which mainly affects tropical rural populations living in areas of abundant wetlands. BU can cause extensive skin lesions and often results in severe disabilities [1]. Out of the 4000 cases declared to World Health Organisation by 14 countries in 2011, over 95% originated in African countries around the Gulf of Guinea [35]. Cameroon declared 256 cases in 2011 and 180 in 2012 [35].

The transmission of MU remains unexplained [4], and the epidemiology of BU is also poorly described. Specifically, although its spatial distribution has been addressed in several settings [78,80,81,130], studies have only examined temporal variations in terms of yearly trends [12,43,131], Seasonal variations in BU incidence were reported in Uganda, where the highest frequency of onset occurred in July-September, five months after the period of high rainfall (March-May) [76]. Several observational studies have reported seasonal changes in the monthly number of cases and hypothesised a link with rainfall variation [5,72,76,132]. However, none of these studies provided quantitative evidence of seasonal changes in BU incidence. Indeed, a formal demonstration would require a sufficiently long time series, with large numbers of cases from a defined source population, and the use of signal analysis techniques adapted to the constraints of disease surveillance and environmental data [89]. A recent study on a large cohort in Benin described a significantly higher number of cases during the dry season, compared to the rainy season, but the methods employed did not allow further characterisation of seasonal trends [22].

Our objective was to investigate the seasonality of BU case incidence in a high endemic area, the Akonolinga district in Centre Cameroon, over more than ten years of follow-up. If significant seasonal variations in incidence were found, we sought to evaluate their association with variations in the surrounding environment. We interpreted these results within the framework of a multidisciplinary research program, in the light of studies in epidemiology, ecology, entomology, and anthropology, realised in Akonolinga.

## Material and methods

### Data

This work was a registry-based study of the monthly number of Buruli ulcer cases diagnosed by the National Reference Laboratory of Mycobacteria in Cameroon and treated in Akonolinga Hospital, Centre Cameroon, from January 2002 to May 2012, as previously reported [130]. Here, we focused on BU incidence in high-risk villages, defined as presenting stable incidence rates >2 cases/1000 person.years (py) over the study period, situated along the Nyong River (Figure 1). We used monthly BU-cases data and cross-checked these cases with some external variables. Because of a suspected link with water, environmental variables included in the analysis were monthly total rainfall and the

monthly average of Nyong river flow in Mbalmayo, a city located approximately 50 km downstream from Akonolinga area [133,134]. Nyong flow data was only available from January 2002 to December 2010 [134].

**Ethics statement**

This study used anonymised case data, aggregated by village and by month, which were collected by the Service de Mycobactériologie of the Centre Pasteur du Cameroun as part of the surveillance activity of the National Reference Laboratory for BU in Cameroon, within the National BU Control Program. In this study, no intervention was performed (either diagnostic or therapeutic) and we only relied on a retrospective collection of anonymous cases authorized by the Cameroonian Ministry of Health.

**Statistical methods**

Wavelet analysis was performed on the time-series of monthly BU cases to determine the significant oscillating modes. This method has been validated in epidemiology and was employed because epidemiological and environmental time-series are typically nonstationary, i.e., their dominant periodic components change over time [89,135–137]. These characteristics may render traditional spectral techniques, such as Fourier analysis, inappropriate to analyse the temporal trend of local variations in frequency and periodicity [89]. We selected the Morlet wavelet for the wavelet decomposition in the periodic band between 0.3 (4 months) and 2 years over the 125 months duration (January 2002 to May 2012). Wavelet coherency was then used to identify and quantify possible statistical associations between two time series, e.g., the BU case time series and one of the environmental variables. Coherency is roughly similar to a classical correlation, but pertains to oscillating components in a given frequency mode for a given time period [89]. We also analysed the phases in the time-series that enabled us to obtain information about the possible delay between incidence and environmental variables (i.e. in phase or out of phase relations). Phase analysis was complemented with the computation of the evolution of periodic components in the one-year mode. Statistical analyses were performed using Matlab (version R2013a, The MathWorks, Naticks, Massachusetts, United States).

**<u>Results</u>**

From January 2002 to May 2012, 562 cases were diagnosed among 24469 inhabitants residing in high-risk villages of the Akonolinga health district (Figure 1), yielding a 2.2 cases/1,000py incidence rate. The raw series is presented in Supplementary Figure 1. Over the study period, median incidence was maximal in March, and a second peak was observed in September (Figure 2A), but no statistically

significant difference was found between the monthly medians (Kruskal-Wallis test, p=0.149). Using wavelet analysis, a one-year periodic signal was identified in the BU cases time-series from 2005 to 2011 (Figure 3A1 and 3B1). This periodicity was found to be statistically significant from mid-2005 (rainy season) to 2009 (the end of the dry season).

Environmental variables showed strong seasonal variations using wavelet analysis (Figure 3A2 and 3B2). Monthly total rainfall and mean Nyong flow all presented strong periodic signals with a one-year period, and a weaker six-month periodicity, corresponding to the alternation of small rainy, small dry, high rainy, and long dry seasons. Because of its shape, the wavelet detected yearly rainfall oscillations between a minimum in December (dry season) and a maximum in July (the middle of the rainy period) instead of the maximal rainfall months of October and November (Figure 2B).

We assessed the coherency of the incident case signal with environmental variables. The one-year periodic signal of the BU case series presented significant coherency with rainfall from the end of 2005 to 2011 (Figure 3A3), and with Nyong River flow from the end of 2005 to 2009 (Figure 3B3). Assuming that changes in the environment (red line on Figure 3A4) preceded changes in BU incidence (blue line on Figure 3A4), phase analyses demonstrated that the cases presented a nine-month lag with rainfall oscillations (phase=$\pi/2$ ($+\pi$), Figure 3A4). A six-month lag with Nyong River flow oscillations (phase=$\pi$ or $-\pi$, Figure 3B4) was also observed when the two signals were coherent.

## Discussion

These results indicate that there is a significant one-year cycle in BU incidence within the high-risk, endemic focus of the Nyong River in Akonolinga, Cameroon. The frequency of BU diagnosis was highest in March, six months after the months of maximum rainfall, i.e. August to October (Figure 2). Phase analysis also indicated that incidence variations presented a six-month lag compared to Nyong River flow oscillations and nine-month lag compared to rainfall oscillations: incidence was maximal nine months after the middle of the rainy period (April to October) and minimal nine months after the dry season. BU incubation period was estimated around 4.5 months in Australia [16], and around three months using Uganda data [5]. The median reported delay between the onset of symptoms and healthcare seeking was five weeks in Akonolinga, thus yielding a delay between infection and diagnosis of approximately five to six months. The frequency of infection would therefore be highest during the high rainy season, from August to October (Figure 4). A similar pattern was observed in the 1970s in Uganda [72,76], Cameroon [138], and more recently in Côte d'Ivoire [131,132]. In the low endemic setting of French Guiana, an overseas territory located near Brazil at the same latitude as Cameroon, periodic peaks after the two rainy seasons were reported [88].

Variations in BU incidence can be seen as the result of variations in population exposure [58], combined with variations in MU concentration in various environmental compartments [105].

Our results are consistent with results of MU detection in the environment in Akonolinga: in a series of aquatic fauna samples systematically collected from June 2012 to May 2013, MU presence in the environment was maximal in August and October [105]. Likewise, in a series of waterbugs collected from November 2007 to July 2008, MU was also found most abundant during the small dry season in July [112].

However, cases are diagnosed every month in Akonolinga: BU dynamics correspond with a baseline incidence rate superimposed with a seasonal component, which could be related to the heterogeneous spatial and temporal distribution of MU. Permanent swamps were positive for MU, irrespective of season, and could represent a permanent risk-source [105]. Temporary risk increases could result from rivers, which were highly positive during the small rainy season, and from flooded areas, highly positive during the following small dry season and high rainy season [105]. The respective contribution of permanent swamps, and the risk-increase related to temporary swamps during the rainy season was previously documented in Uganda [72].

The seasonal signal was detected over five consecutive years. Coherency was found between BU incidence and variations in both the Nyong flow and rainfall, which could indicate transient forcing of BU incidence by seasonal phenomena. These seasonal phenomena could influence the disease risk differently from one time period to another.

Growing evidence supports a key role of MU hosts, especially insects such as aquatic Hemipterans (waterbugs) and mosquitoes, in MU distribution, and probably in its transmission [4]. Insect-hosts lifecycles likely influence MU presence and could provide another complex link between climate variables and BU incidence (Figure 4). Insects have specific seasonal dynamics: their hatching is often triggered by alternating rainy and dry periods, and specific species, termed polyvoltine, can emerge several times a year [139]. For example, in Akonolinga, MU-positive Hemipterans were most abundant from January to March and in August (Figure 4) [105,112].

We hypothesise that a key parameter is the seasonal flooding of the Nyong River plain, documented as a major risk factor in both previous spatial analysis [130], and individual risk assessment.[58] During the rainy season, the river rises between three and five meters, flooding the vast plains upstream of Akonolinga. The flooding creates temporary bodies of waters and swamps. Through their daily practices, the rural populations of Akonolinga are exposed to these environments which they use for water collection, fishing, and cultivation, especially during the months of August, September, and October (Figure 4) [140]. These temporarily-flooded, highly-perturbed environments are strongly dependent on climatic conditions and could therefore contribute differently to BU incidence from one year to the next. They could disappear more rapidly during years of low rainfall and inundation, compared to those of higher rainfall. On the contrary, bacterial production could be

washed up from small water collections when flooding is more intensive. Indeed, the seasonal signal was strongest in years when the Nyong River flow presented lower yearly variations (2005, 2006, 2008). It will be interesting to assess the effects of low frequency climatic events, such as El Niño Southern Oscillation (ENSO), which has been shown to affect low endemic BU incidence dynamics in French Guiana [88]. In Uganda, exceptional flooding has also been linked to an increase in BU incidence and a spread of BU endemic region [74].

In conclusion, we showed that there are significant seasonal variations in BU incidence in the endemic area of Akonolinga, Cameroon. Combining the results of previous studies, we link these variations to the fluctuations of MU occurrence in the environment, which is likely driven by the dynamics of freshwater ecosystems of the Nyong River. The risk of transmission appears highest during the high rainy season (August-October). Public health authorities should advise populations to increase their protective behaviours during this season, and should intensify case detection efforts in subsequent months to ensure early diagnosis and care.

**References**

*Les références bibliographiques ont été unifiées avec celles du manuscrit. Elles sont consultables dans la section bibliographie.*

**Figures**

**Figure 1. Study area.**
Map of the study area showing the villages of the high risk area in Akonolinga (in red), and the location of Akonolinga in Cameroon (inset).

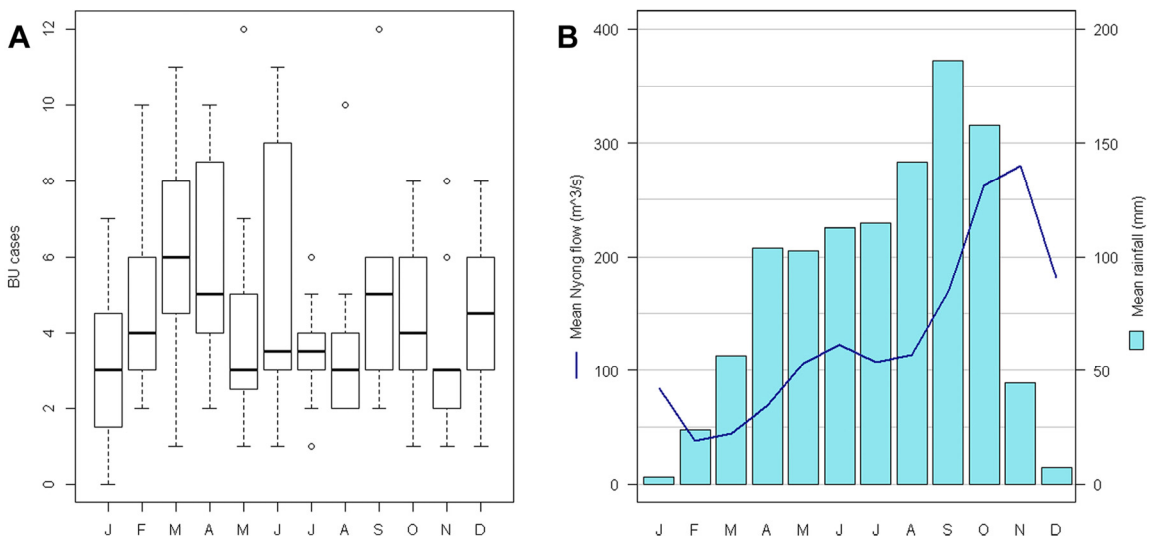



**Figure 2. Monthly variations of cases and environmental data.**
Figure 2A: Boxplot of the monthly number of BU cases from Akonolinga highly endemic area.
Figure 2B: Seasonal variations of the environment in Akonolinga area. Bars: Total monthly rainfall in mm (average over 2002-2012); line: mean Nyong flow in m3/s (average over 2002-2010).

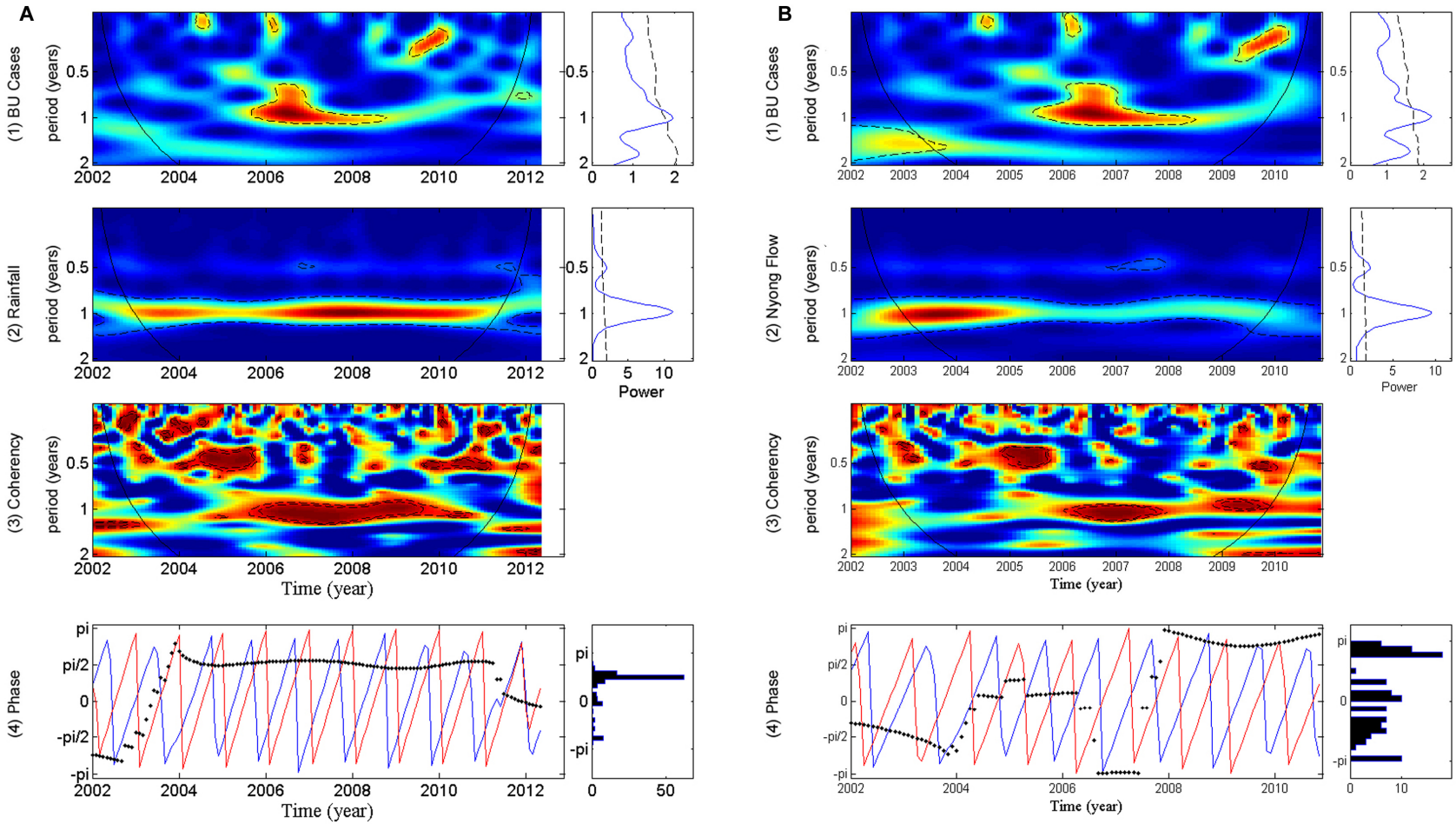
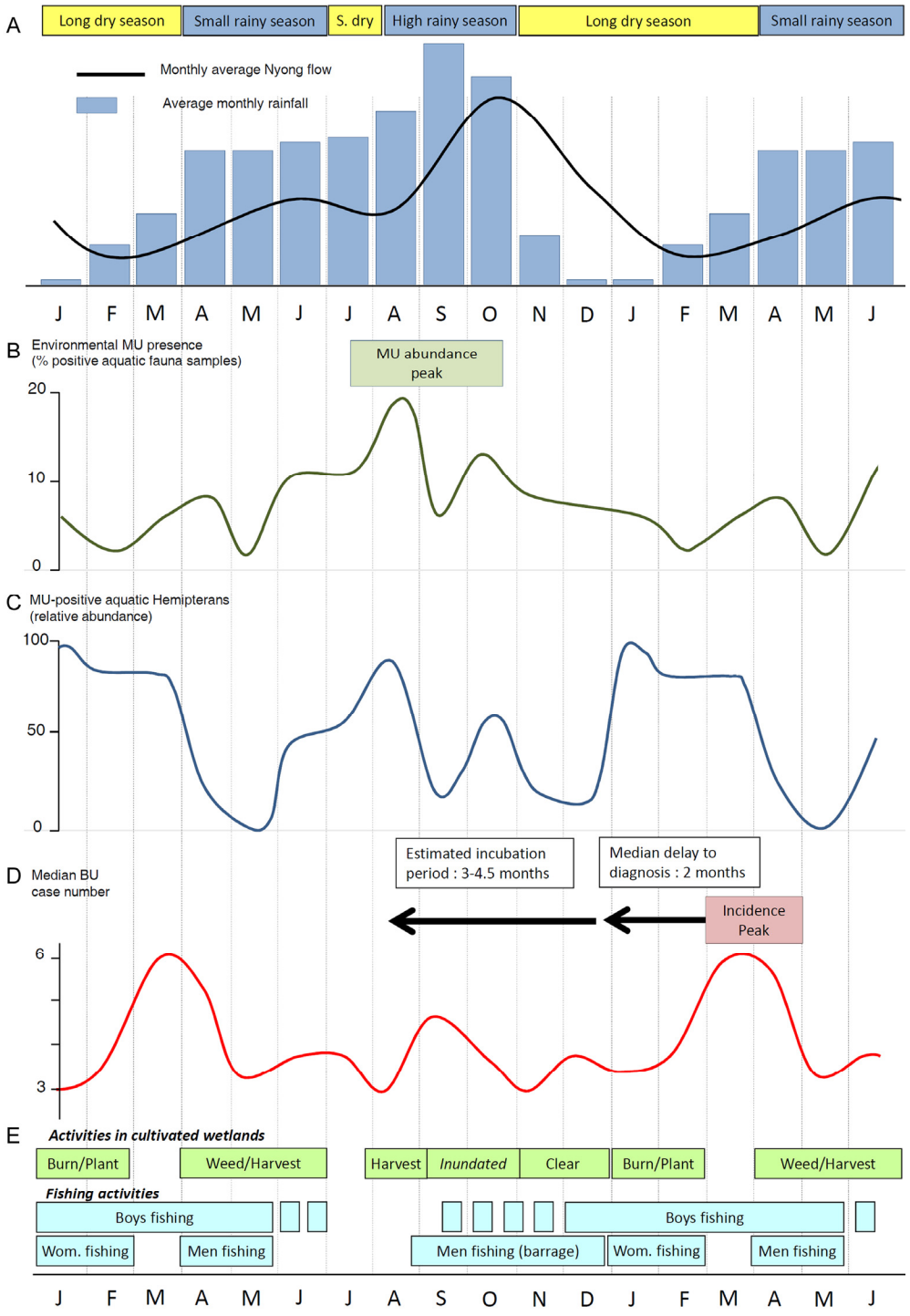



**Figure 3. Wavelet analysis of BU case series.** Figure 3A: BU cases and rainfall, Jan 2002- May 2012. Figure 3B: BU cases and Nyong flow, Jan 2002-Dec 2010.

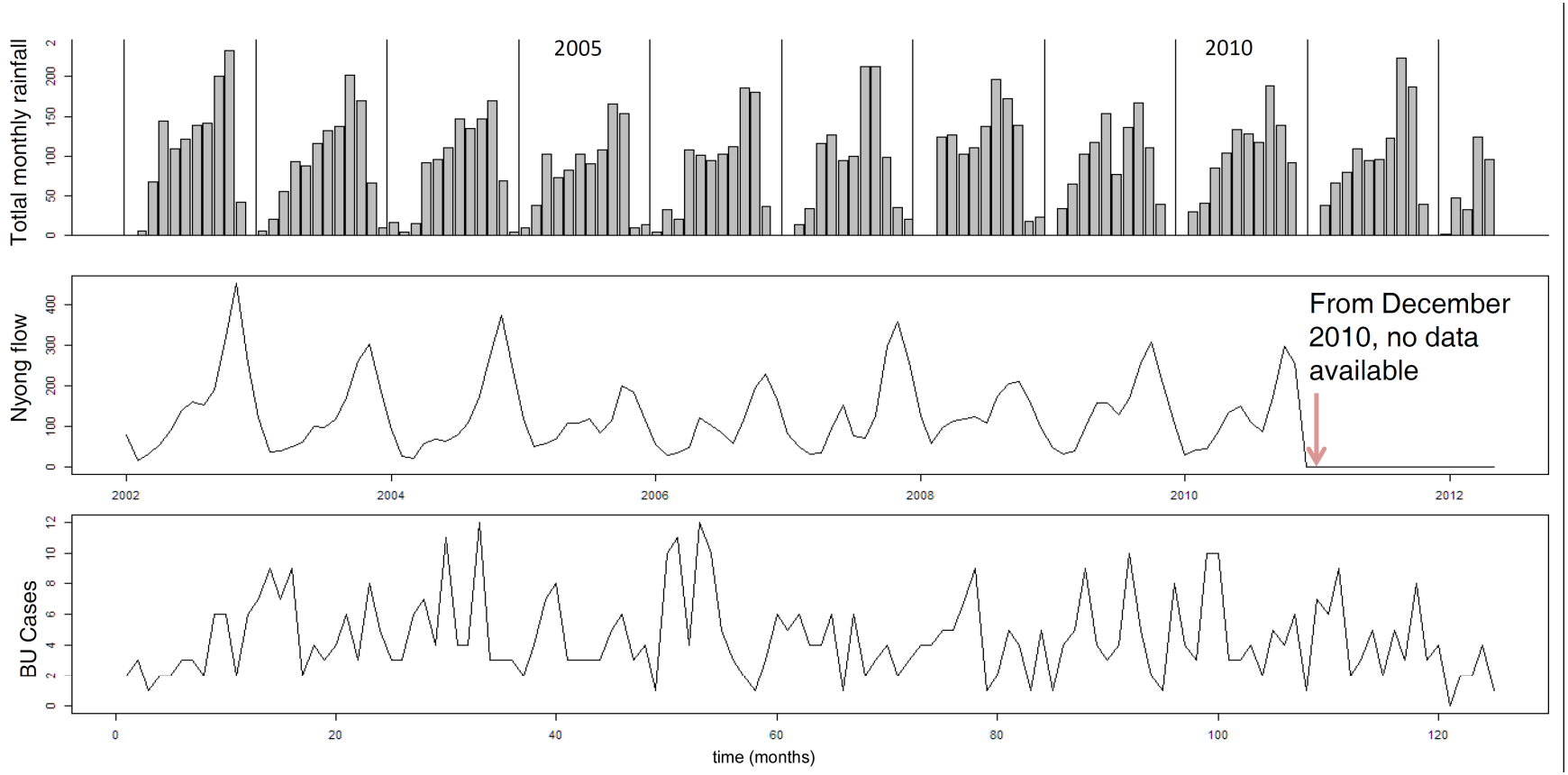
Each panel shows: (1) the analysis for the time series of BU cases, (2) for the environmental variable, (3) coherency between the two signals, (4) phase analysis for the one-year period, BU cases are represented in blue and environmental variables in red.

(1)-(3): Detection of periodic signals is performed within a confidence cone which excludes the beginning and the end of the series where edge effects would be too likely. Statistical significance of the signal was assessed by bootstrap methods and statistically significant zones are circled with dashed lines. Significant periodic signals are confirmed on the entire series by Fourrier analysis (panels 3A1 and 3B1, on the left).




**<u>Figure 4. Schematic representation of the seasonal changes in Akonolinga region and possible links between environment, *Mycobacterium ulcerans* (MU) presence, human exposure and Buruli ulcer (BU) incidence.</u>** 18 months are shown to allow better visualization of delays.

A : Average monthly rainfall and mean Nyong flow [133,134]; B : MU presence in the aquatic environment (relative abundance of MU-positive samples)[105]; C : Relative abundance of MU-positive aquatic Hemipterans [105]; D : Monthly median BU cases (this study); E : selected activities involving contacts with environments at risk (Giles-Vernick T, personal communication).




**Appendix Figure 1. Original time-series included in the analysis.**
From top to bottom: rainfall, Nyong River flow, and BU-cases time monthly series.

# Chapitre 4 : Une possible implication du milieu terrestre dans la chaîne de transmission ? Recherche de *Mycobacterium ulcerans* dans la faune arthropode domestique d'Akonolinga.

Cette partie représente est une incursion vers l'entomologie de terrain, à la recherche d'une confirmation biologique au rôle protecteur identifié pour l'utilisation des moustiquaires à Akonolinga [58] et à Bankim (Chapitre 2). Notre objectif était de vérifier si MU pouvait être présent dans l'environnement domestique. Cette hypothèse reposait principalement sur les résultats indirects des études cas-témoins, et sur l'identification de moustiques positifs dans un contexte très différent en Australie [115], et sa fragilité était problématique.

Nous avons donc cherché à pouvoir garantir la robustesse, non seulement d'un résultat positif, mais également d'un résultat négatif, qui était très probable. Nous avons mené un échantillonnage mensuel et systématique de la faune arthropode domestique dans deux sites d'incidence élevée dans le district d'Akonolinga. Aucun groupe taxonomique n'a été ciblé en particulier, et différentes méthodes de collecte ont été combinées pour augmenter la diversité des groupes ainsi capturés.

La quantité de matériel collectée est énorme, et les travaux de tri, d'identification et d'analyse sont encore en cours.

L'article qui suit présente les résultats de l'analyse des trois premiers mois de collecte, et présente pour la première fois la détection d'arthropodes positifs pour MU dans une zone endémique en Afrique. Il suggère d'explorer plus en détail le possible rôle d'arthropodes terrestres dans la circulation, et peut-être la transmission de MU.

Cet article est en cours de finalisation pour être soumis à Emerging Infectious Diseases.

# First detection of *Mycobacterium ulcerans* in domestic arthropods in the Buruli ulcer endemic focus of Akonolinga, Cameroon

Jordi Landier, Jean De Matha Ndengue, Philippe Le Gall, Jérémie Babonneau, Erwan de Gavelle, Jean-Baptiste Souraud, Arnaud Fontanet, Sara Eyangoh, Laurent Marsollier, Gaëtan Texier

**Affiliations**

Institut Pasteur, Unité de Recherche et d'expertise en Epidémiologie des Maladies Emergentes, Paris, France (J. Landier, A. Fontanet)

Service d'Epidémiologie et de Santé Publique, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon (J. Landier, G. Texier)

Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, Réseau International des Instituts Pasteur, Yaoundé, Cameroon (J. Landier, J. Ndengue, S. Eyangoh, E. de Gavelle, R. Kamgang, J. Ossomba)

IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UR 072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 91198 Gif sur Yvette Cedex, France et Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France. (P. Le Gall)

Service d'Anatomo-pathologie, Hôpital Bégin, Paris, France (J.B. Souraud)

ATOMycA, Inserm Avenir Team, CRCNA, Inserm U892, 6299 CNRS and LUNAM, CHU and Université d'Angers, Angers, France (L. Marsollier, J. Babonneau)

Chaire Santé et Développement, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France (A. Fontanet)

UMR 912 - SESSTIM - INSERM/IRD/Aix-Marseille Université - Faculté de Médecine, Marseille France (G. Texier)

## Introduction

Buruli ulcer (BU) is an extensively damaging skin infection, caused by *Mycobacterium ulcerans* (MU), and responsible of large skin lesions frequently occasioning invalidating sequellaes even for patients receiving adequate treatment [1,22]. Over 95% of BU cases declared to World Health Organization originate from West and Central Africa. Cameroon reported 256 cases in 2011 and 160 in 2012 [35], 40% of which originated from Akonolinga BU endemic region [130]. The mode of transmission of MU to humans remains unknown and the precise location of MU in the environment has to be determined [4].

Several arguments indicated that arthropods were likely important hosts of MU. Following initial description of MU-positive aquatic Hemipterans [106], studies showed that these insects could become infected with MU by feeding on infected preys, and that MU could be transmitted to mice by their bite [92,121]. An environmental MU isolate available was obtained from a semi-aquatic Hemipteran [93] and MU was detected in Hemipterans captured in endemic regions of Cameroon [109,112]. MU was also detected in various animal and vegetal compartments of the aquatic environment in African endemic regions using qPCR: water filtrate was repeatedly reported positive [43,102] as well as vegetal debris and aquatic plants [94,104], and a wide diversity of aquatic fauna groups, among which a large majority of Arthropods [105,107]. In parallel, mosquitoes were captured in a BU-endemic focus in Australia and several species were found positive by MU-specific qPCR [115,116]. In the laboratory, mosquito larvae could easily be infected by MU at the gut level, but MU-infection of adult mosquitoes remained unsuccessful [120]. However, the number of mosquitoes analyzed remained very small compared to the number of mosquitoes tested in the field [120].

In addition to studies focusing on detection of MU in the environment, several indirect elements pointed at a possible MU transmission outside the aquatic environment and a possible involvement of terrestrial insects. In Cameroon, two independent case-control studies performed in two different settings at two different periods found a protection against BU associated with using a bednet [58,141]. In Australia, a case-control study found a protective effect of using insect repellent while gardening, while reporting mosquito bites was a risk factor [70]. Replication of these same results, by different teams indicated that the effect found for bednets was less likely to be caused by confounding.

The picture rendered by studies of MU presence in the environment of endemic regions appears relatively complex. First, the tools to go beyond detection of MU-molecular signature are not available yet : culture from environmental samples succeeded only twice in the recent years [92,93] ; genotyping of environmental positive samples to ensure proximity with pathogenic strains is not possible ; and MU location in or on specimen collected from the environment has only been confirmed microscopically in

possum lesions from Australia [103]. Second, comparison between settings is extremely difficult, since studies in African endemic regions focused almost exclusively on detecting MU in the aquatic environment, while studies from Australia only addressed terrestrial fauna [4]. In this study, our primary objective was to assess for the first time if MU could be found in non-aquatic arthropods in an African region endemic for BU. We focused on the domestic environment to evaluate if the protective effect found for bednets in epidemiological studies had any biological support. If positive arthropods were found, the secondary objective was to document which taxa, which functional groups and which locations were positive.

## Material and methods

### Location and frequency of sampling

This study was performed in the district of Akonolinga, Centre region, Cameroon. BU was reported in the area in the 1970s [129], and it was shown to be endemic for BU since at least 2001 [79]. In order to maximize the probability of capturing positive insects, we located our captures in two specific zones of Akonolinga district (Figure 1). The "quartier Lac" neighborhood, was an urban area of Akonolinga town with high BU incidence, and the 4 rural villages near the town of Endom, south-west of Akonolinga, were located in an area where incidence was shown to be increasing [130]. Both study zones were located near the Nyong River, which was shown to be a major risk factor for BU [58,130] and to host MU-positive aquatic fauna [105,112]. In "quartier Lac" and two villages of Endom zone (Meyo and Aba-Bita), houses were selected based on surrounding characteristics to approximate the different environments in the neighborhood at each sampling period and based on voluntary participation of inhabitants. In the remaining two villages (Ndambene and Ebouk-Esiki), all houses were sampled over the study period.

### Domestic and peri-domestic Arthropod fauna sampling

Indoors domestic arthropod fauna was sampled within 5 houses each day using two methods. First, a miniature CDC light-trap (John Hock and son/Bioquip), with a 6V bulb was placed in either a bedroom or the living room from 06:00pm to 08:00am. Second, the following morning, domestic fauna was collected by spreading white sheets over the floor and furniture of one bedroom (the same bedroom that received the CDC light-trap) and the living room, and spraying pyrethroid-based insecticide (brand: ORO®). After 15 minutes, the sheets were retrieved and the arthropod fauna was collected in a plastic box and killed using ethyl acetate.

Outdoors, peri-domestic Arthropods that would be attracted by light or human activities in the evening were collected using 3 CDC light-traps (2 with 6V bulbs and 1 with UV-light tube) set outside 3 of the indoors sampled houses.

**Identification of specimen**

In the field, the collected specimens were sorted visually in taxonomic group and stored in 2mL or 50mL tubes (according to size) in 70% ethylic alcohol awaiting precise determination in the laboratory.

In the laboratory, arthropods were sorted according to morphologic characteristics using a binocular magnifier. Specimen were counted and recorded individually in a database. Morphotypes were identified using identification keys [142,143]. Samples were determined at the family level or lower if possible, else at the superfamily level. In order to avoid contamination, dispensable Petri dishes were used for sorting the insects from one house then discarded. Forceps were used for sorting insects from one house then decontaminated in 1M bleach solution during 2h, rinced with distillated water and dried before being used again.

After sorting and identification, insects were pooled for molecular analysis in groups of 50-60 individuals for the small to medium taxa and 10 individuals for the largest. A pool included only insects of a single morphotype, house and month. However, to limit PCR costs, insects belonging to rare species were pooled according to family or order instead of genus. Likewise, less abundant insects from different houses were grouped in the same pool if they had been collected during the same month and, if possible, in the same location (neighborhood or village). The respect of quality procedures to avoid cross-contamination was assessed regularly by the team in charge of sorting and identifying the samples.

**DNA extraction and purification from pools of Arthropods**

Pooled individuals were all ground together and homogenized in 50 mM NaOH solution using Tissue Lyser II (QIAGEN). Tissue homogenates were heated at 95°C for 20 min. DNA from homogenized insect tissues was purified using QIAquick 96 PCR Purification Kit (QIAGEN), according to manufacturer's recommendations.

**Detection of MU DNA by quantitative PCR**

Oligonucleotide primer and TaqMan probe sequences were selected from the GenBank IS2404 sequence [144] and the ketoreductase B (KR) domain of the mycolactone polyketide synthase (mls) gene

from the plasmid pMUM001 [98,144]. qPCR mixtures contained 5 µl of template DNA, 0.3 µM concentration of each primer, 0.25 µM concentration of the probe, and Brilliant II qPCR master Mix Low Rox (Agilent Technologies) in a total volume of 25 µl. Amplification and detection were performed with Thermocycler (Chromo 4, Bio-Rad) using the following program: 1 cycle of 50°C for 2 min, 1 cycle of 95°C for 15 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

**Internal quality control for molecular methods**

Internal quality control of the DNA extraction and purification as well as MU DNA detection was set up using the following steps: 10% of extraction and purification controls were included during the whole process, as well as qPCR mix controls and DNA inhibition controls during the qPCR steps. DNA extracts were tested in duplicates. Quantitative readout assays were based on external standard curve with MU (strain 1G897) DNA serially diluted over 5 logs (from 106 to 102 U/ml). Finally, samples were considered positive only if both the gene sequence encoding the ketoreductase B domain (KR) of the mycolactone polyketide synthase and IS2404 sequence were detected, with threshold cycle (Ct) values strictly <35 cycles [105].

**Data analysis**

Graphical representation and statistical analysis were performed using STATA 12.0 software (Stata Corp, College Station, Texas). For proportions of MU-positive pools, exact binomial 95% confidence intervals were calculated. In order to evaluate the precision of results for negative taxa, we used a binomial distribution to calculate the probability to obtain the same negative result with the same number of pools assuming that the taxon had the mean prevalence rate of MU. For analyses at the family taxonomic level and at house level, correlations were assessed using non parametric correlation coefficient (Spearman). Mapping was performed using ArcGIS 10.0 (ESRI).

## Results

### Sampling efforts and collection results

From January to March 2013, we collected domestic and peri-domestic Arthropods from 71 houses in two sites and five neighborhood or villages in Akonolinga BU focus, Central Cameroon. Among these, 63 houses were sampled once and 8 were sampled twice. Collection methods were implemented gradually, starting with indoors light-traps and residual fauna. This corresponded to 31521 individual specimens collected during14 nights, totaling 166 collection events (1 method over 1 night). Specimens were mainly insects (n=30,078 - 95.5%) and arachnids (n=1380 - 4.4%). The remaining 0.1% consisted of millipedes (Diplopoda, n=3) and woodlice (Isopoda, Malacostraca, n=53).

Order was determined for 31512 (99.9%) specimens, among which 29776 (94.4%) were identified up to family taxonomic level or lower. In total, 22 orders and 106 families were represented and corresponded to 123 distinct taxa determined at the family or order level depending on how precisely specimens could be classified. The ability of each method to collect specimens from a given order varied considerably (Table 1 and Appendix Table 1). The combination of methods enabled to span a large diversity of taxa in our collection (Figure 2). Out of the 123 distinct taxa identified, 30 were represented by more than 100 specimens, 14 by 20 to 99 specimens, and 79 by less than 20 specimens.

MU detection in domestic arthropod pools

Molecular detection of MU was performed on 29,976 specimens from the 52 most abundant taxonomic groups. In total, 85 MU-positive pools were identified out of 651 (13.1%). Positive specimens were identified in 20 families (Table 2 and Appendix Table 2) and median positivity rate per family was 17.7%, Interquartile range (IQR)=[10.4-27.7]. Eight out of 20 positive families belonged to the order Diptera.

The median amount of bacteria detected among positive pools from one family using KR probe ranged from 206 to 2,895 bacteria/mL (Appendix Table 2).

For low abundance taxa, confidence intervals were extremely large around positive-rate values. Negative results were based on the analysis of very small samples. We calculated that to have less than 5% of chances to randomly obtain all negative pools from a species with a 13.1% proportion of positive pools (the observed mean proportion of positive pools), it was necessary to test more than 20 pools. Therefore, we cannot be sure that the negative results do not reflect under-sampling rather than "true negative". For high abundance taxa (>20 pools), prevalence estimates were more precise and we could single out three taxa with MU-prevalence rates significantly above the observed mean: Staphylinidae,

Tineidae and Psychodidae (Supplementary Figure 1). There was no significant correlation between MU-positive proportion of pools from a taxonomic family and number of pools tested (r=0.29, p=0.097).

**Urban-rural comparison**

Overall positivity rate was 19% of pools in Akonolinga urban site and 8.6% in the rural area. Of the 20 positive families detected, only 6 families were found positive both in urban and rural areas, namely Blattidae, Gryllidae, Tineidae, Drosophilidae, Culicidae, Psychodidae, with positive rates ranging from 6.7% to 33.5% (Table 4). Of note, Cecidomyiidae, which presented with a high proportion of positive in urban area (41.7%), were trapped in large numbers in the rural area (n=43 pools) with no detection of MU. On the contrary, three taxa were positive in the rural area but not in the urban area: Vespidae, Aranaea and Staphylinidae.

**Ecology of positive taxa**

Positive taxa showed a wide range of ecological characteristics at the larval or adult stages (Supplementary Table 3). Several taxa had aquatic larvaes (Culicidae, Chironomidae, Psychodidae), other taxa were terrestrial, several of them being groups mostly found indoors (Blattidae, Gryllidae). Terrestrial adults had a wide diversity of feeding behaviors from predators (Staphylinidae, Aranaea) to phytophagous (Hemiptera, Drosophilidae) or saprophagous (Battaria, Trogidae, Tipulidae). Three taxa of Dipteran were, or included, hematophagous species: Culicidae, Ceratopogonidae and the sub-family Phlebotominae among Psychodidae. Nearly all levels of terrestrial foodwebs were found among positive taxa. However, comparisons of basic ecological characteristics did not show major associations between laval or imago feeding behaviors or habitats and positivity of MU (Supplementary Table 3 and Supplementary Figure 2).

**Location of positive houses**

At the house level, three categories of houses were distinguished: first, houses where no positive specimen were detected (n=24 - 38%) or houses which contributed specimens to positive pools from four houses or more, for which tracking positive back to a house was impossible (n=8 - 13%); second, houses which contributed specimens to a positive pool from 2 to 3 different houses (n=12 - 19%); third, houses which contributed all specimens to one or several positive pools (n=19- 30%). For the latter, the proportion of positive pools ranged from 2.6 to 17.8%.

We mapped MU detection results at the house level (Figure 4). In Akonolinga urban area, no association was found between MU-positivity and distance to the swamp, or to the Nyong River (respectively r=-0.058, p=0.73 and r=-0.04, p=0.78). In the rural area, the proportion of MU positive pools per house was negatively correlated with distance to the Nyong River (r=-0.48, p=0.012).

**Discussion**

In this study, we demonstrate that non-aquatic Arthropods were positive for MU in Akonolinga BU-endemic region of Cameroon, in Central Africa. Using reference qPCR methods [98] and focusing on the domestic environment, we showed that a wide diversity of Arthropods could be found positive for MU in and around the houses. Among these Arthropods, we identified three groups of hematophagous insects: Culicidae, as shown previously in Australia [115,116], but also two previously unsuspected groups, Ceratopogonidae and Psychodidae. Araneae was an additional biting-arthropod group. Six taxa were positive both in the rural and the urban environment, which could indicate that they play a key role in MU presence or dynamics.

This study of non-aquatic arthropods associated with MU is unique by its location in a BU-endemic region of Africa, a continent which contributes over 95% of all reported cases. It is also a first by its collection of a large diversity of terrestrial taxa, previously unstudied in BU-endemic settings, within and outside Africa. Our results are, however, consistent with previous MU detection reports in Australian Culicidae, with similar positivity rates across a wide diversity of Culicidae species [115]. Our collection methods included CDC light-traps as used in Australia, but Aedes genus mosquitoes, which represented the largest population in Australia (>10,000) and had a 5% positivity rate, were not found in Akonolinga, even though they were reported in the neighbouring city of Ayos [145]. In this study, *Culex* spp mosquitoes were most abundant and the proportion of positive pools was 11%. This two-fold difference can be partly explained by our choice of a larger size of qPCR pools (in average 60 versus 14 mosquitoes per pool). We report a similarly higher proportion of positive Anopheles, although on a small number of mosquitoes as well [115].

Our finding of a large diversity of positive terrestrial arthropods was unexpected, but should be considered in the light of recent results obtained in the aquatic fauna of Akonolinga region. A wide range of positive pools was described across various taxonomic and functional groups, with proportion of positive pools between 5 and 15% [105]. Our results indicate that this broad MU-positivity is not

limited to the aquatic environment of endemic regions. Furthermore, among the taxa collected in the domestic environment, several are adults from a species with aquatic larvae. These positive taxa (Chironomidae, Culicidae, Psychodidae) had also positive aquatic larvaes in Akonolinga [105], and suggest that MU could be circulating from aquatic to domestic environments. In addition, we identified positive taxa among endophilic groups, such as Gryllidae and Blattidae, and among non-aquatic exophilic groups such as Drosophilidae. Finding MU in groups which have no connection to the aquatic environment suggests that there is a circulation of MU outside the aquatic environment, most likely within foodwebs. This aspect is confirmed by the high proportion of positive pools found for Staphylinidae, an exophilic predator group.

Comparison between rural and urban area allowed identification of several taxa which were positive in the urban area and negative in the rural zone: Chironomidae, Cecidomyiidae, Lygeidae, Delphacidae. Among these Cecidomyiidae were collected in larger numbers in the rural area, where they were consistently negative, while they presented with a high proportion of positive pools in the urban area. Based on the higher proportion of positive pools collected in the urban area, we can suspect that MU was more easily acquired by arthropods. On the contrary, taxa which were found positive in the rural area but not in the urban area all exhibited predators behaviors: Vespidae, Aranaea and Staphylinidae.
Furthermore, in the rural region where environment heterogeneity was higher and distances were larger, we identified a correlation between MU positivity and distance to the Nyong. Taken together with the strong increase in BU risk associated with Nyong River proximity [130], this suggests that circulation of MU could also occur from the aquatic to the domestic environment.

This study suggests new research directions in terms of MU transmission mechanism. First, this study does not allow dismissing the protection from BU associated with bednets as a mere statistical artifact from epidemiological studies. On the contrary, it provides a biological plausibility by demonstrating that MU is found in arthropods within the houses of endemic regions. Our finding of many positive taxa with various ecological characteristics suggests that several ways of contaminations must be considered. This study also suggests considering potential roles for other hematophagous insects which were found positive, although trapped in small numbers: Ceratopogonidae, vectors of several viruses and parasites and Phlebotominae, a subgroup from the family Psychodidae, vectors of Leishmania and other pathogens. Both groups are pool-feeding hematophagous insects: their mouthparts inflict a “chewing” wound upon bite, unlike Culicidae who catheterize a capillary vessel using their proboscis. While there is

no evidence that MU is circulating in the blood and could be taken up by mosquitoes, pool-feeding insects could acquire it from biting the skin close to a lesion. Infection by the bite of a sandfly was hinted at by authors reporting coinfection between Leishmaniasis and MU in a patient originating from South America [146]. Following the experimental proof that Hemipterans could transmit MU, we suggest that further experiments be undertaken regarding domestic hematophagous insects, with proper choice of species and designs.

This study underlines also the lack of tools to connect environmental MU-positivity results to Buruli ulcer disease. The reference qPCR methods used for this wide screening are able to detect MU DNA with high sensitivity and specificity, but several questions remain unanswered about the positive organisms detected using this method. First, we would need to know if what we detect using qPCR is viable MU bacilli, or only fragments or simple DNA. Second, it is crucial to distinguish where MU is located in positive organisms: legs, cuticle, mouthparts, gut, salivary glands… Analysis of MU location would help understanding how these organisms could have become infected, and which role they might be playing in the transmission or circulation of the bacterium.
MU-positivity appears to be widespread in the environment, but BU cases are not found in high numbers, and MU genetic diversity is relatively low among patient strains. Understanding the phylogenetic relationships between MU strains detected in environmental samples and in Buruli ulcer lesions would provide important clues on where the infecting strains come from, whether they are ubiquitous or localized, and how they were acquired.

These results warrant increasing the search for MU to other seasons, as significant variations of MU presence were demonstrated in several but not all aquatic environments. Broadening further the search for MU hosts in the environment of BU endemic regions also has to be considered. If MU is able to circulate from the aquatic environment to the domestic area, whether in arthropod hosts or passively, for example on fishing nets brought back from the river, MU-positive arthropods could also be found in environments in between these two, such as river banks, swamps, fields, where exposure to humans would be high and were transmission could occur easily.

**References**

*Les références bibliographiques ont été unifiées avec celles du manuscrit. Elles sont consultables dans la section bibliographie.*

**Acknowledgments**

The authors would like to thank the populations of Akonolinga district for their participation and the local authorities and medical staff for their support. Special thanks go to Roger Kamgang and Joachim Ossomba, and to community health volunteers Philippe-Emmanuel Ekoto and Michel Ekoto for making field work possible and convivial. Thanks also to the field team members Jean-Pierre Agbor, Michael Piameu, Billy Tene Fossog, Jean-Claude Rimis, and to Isabelle Morlais from IRD Cameroon, Parfait Awono and Josiane Etang from OCEAC for their friendly advice and support. We are also grateful to Anna-Bella Failloux, Ken Vernick and Paul Reiter at Institut Pasteur Paris, Christophe Rogier IP Madagascar, Jean-François Guégan and Andres Garchitorena (IRD) for fruitful discussions on this project, as well as all members of the EXTRA-MU consortium.

**Funding**

This research was supported by grants from the Fondation SANOFI-Espoir and the French National Research Agency (ANR 11 CEPL 007 04 EXTRA-MU), with additional funding from the Fondation Raoul Follereau. JL is supported by fellowships from the French Ministry of Higher Education and Research and from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT 20130928241)

**Table 1. Main Arthropod orders (n≥100) collected in the domestic environment in Akonolinga town and Endom rural area from January to March 2013, by collection method used.** Total number of specimens collected and between brackets, average number of specimens per method per house.

| Order | Residual fauna | UV-CDC light-trap | Indoors CDC light-trap | Outdoors CDC light-trap | Total | % Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aranaea | 1,329 (19.0) | 1 (0.2) | 36 (0.5) | 6 (0.3) | 1,372 (8.3) | 4.4 |
| Blattaria | 596 (8.5) | 0 (0) | 2 (>0.1) | 0 (0) | 598 (3.6) | 1.9 |
| Coleoptera | 162 (2.3) | 1,181 (236.2) | 37 (0.5) | 180 (9.0) | 1,560 (9.5) | 5.0 |
| Diptera | 2,347 (34) | 1,127 (225.4) | 6,914 (98.8) | 3,759 (188.0) | 14,147 (85.7) | 44.9 |
| Hemiptera | 40 (0.6) | 328 (65.6) | 276 (3.9) | 418 (20.9) | 1,062 (6.4) | 3.4 |
| Hymenoptera | 4,481 (64.0) | 147 (29.4) | 21 (0.3) | 77 (3.9) | 4,726 (28.6) | 15.0 |
| Lepidoptera | 372 (5.3) | 215 (43) | 700 (10) | 443 (22.2) | 1,730 (10.5) | 5.5 |
| Orthoptera | 5,158 (73.7) | 4 (0.8) | 1 (>0.1) | 1 (<0.1) | 5,164 (31.3) | 16.4 |
| Psocoptera | 875 (12.5) | 1 (0.2) | 1 (<0.1) | 1 (<0.1) | 878 (5.3) | 2.8 |
| Zygentoma | 147 (2.1) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 147 (0.9) | 0.5 |
| Other orders* | 79 (1.1) | 22 (5.5) | 6 (0.1) | 21 (1.1) | 128 | <0.1 |
| Indetermined | 6 | 1 | 0 | 2 | 9 | <0.1 |
| **Total** | **15,592 (222.7)** | **3,027 (605.4)** | **7,994 (114.2)** | **4,908 (245.4)** | **31,521 (191.0)** | **100** |
| | | | | | | |
| **Number of houses using method** | **70** | **5** | **71** | **20** | **166** | |

* n=12 orders with <100 specimen (see Appendix table 1)

**Table 2. *M. ulcerans* detection in the main domestic Arthropod families collected in Akonolinga, Cameroon.** All positive families are shown and largest negative families. Detailed results are provided in Appendix Table 2.

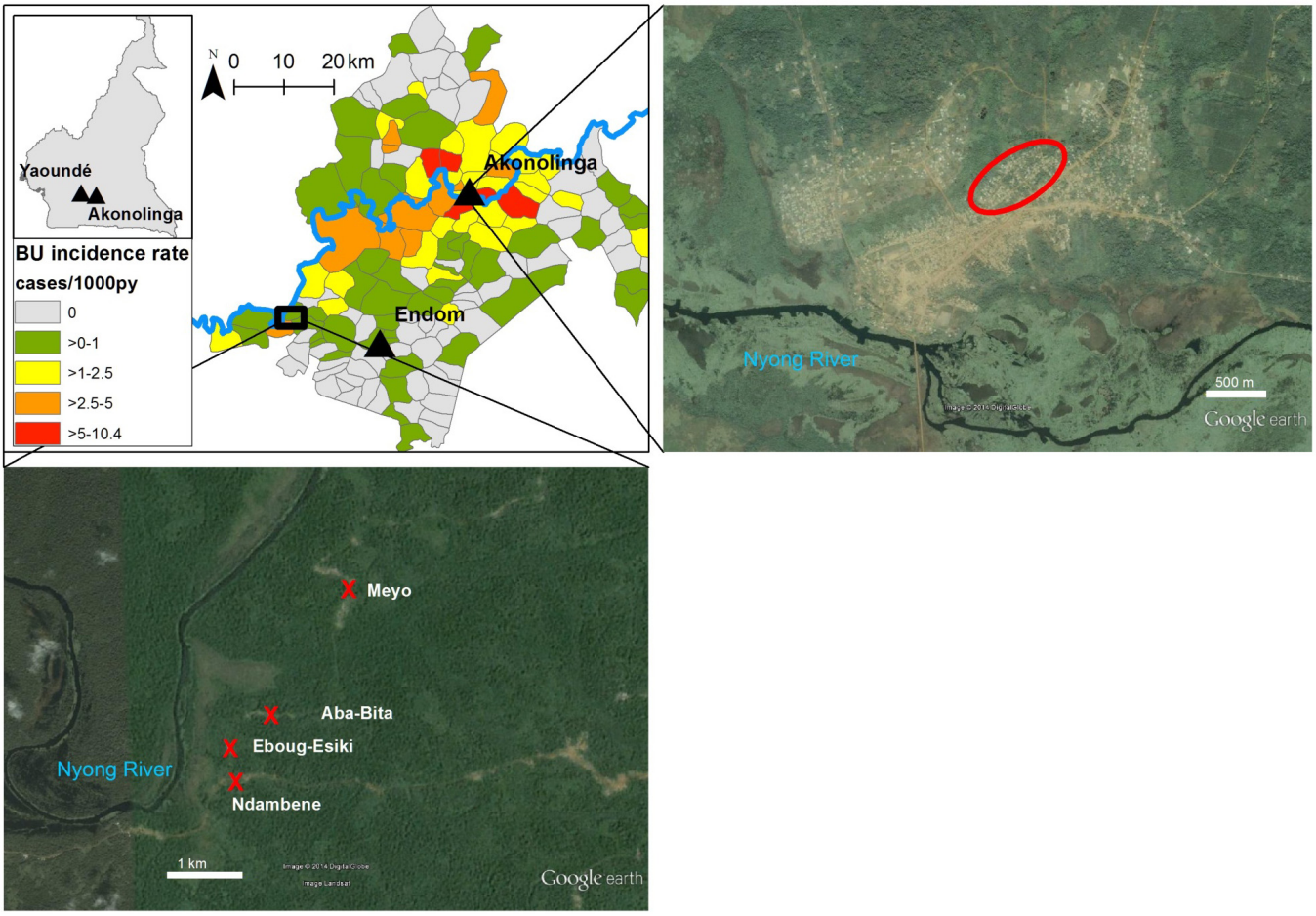
| Order | Family | Specimen analyzed (N=) | Pools analyzed (N=) | MU-positive pools (N=) | % positive pools | [95%CI] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aranaea | | 1,361 | 29 | 1 | 3 | [0.1-18] |
| Blattaria | Blattidae | 577 | 46 | 5 | 11 | [4-24] |
| Coleoptera | Staphylinidae | 580 | 12 | 6 | 50 | [21-79] |
| | Trogidae | 241 | 5 | 1 | 20 | [0.5-71] |
| Diptera | Cecidomyiidae | 2,724 | 55 | 5 | 9 | [3-20] |
| | Ceratopogonidae* | 130 | 4(2*) | 1 (1*) | 25 | [0.6-81] |
| | Chironomidae | 1,234 | 26 | 4 | 15 | [4-35] |
| | Culicidae | 5,060 | 81 | 9 | 11 | [5-20] |
| | Drosophilidae | 1,055 | 20 | 3 | 15 | [3-38] |
| | Muscidae | 414 | 13 | 0 | 0 | |
| | Psychodidae* | 2,699 | 57(2*) | 19 (0*) | 33 | [21-47] |
| | Sciaridae* | 308 | 8(2*) | 3 (0*) | 38 | [9-76] |
| | Tipulidae | 176 | 8 | 2 | 25 | [3-65] |
| Hemiptera | Cicadellidae | 658 | 18 | 1 | 6 | [0.1-27] |
| | Delphacidae | 63 | 4 | 1 | 25 | [0.6-81] |
| | Lygaeidae | 58 | 4 | 1 | 25 | [0.6-81] |
| Hymenoptera | Formicidae | 4,076 | 70 | 4 | 6 | [2-14] |
| | Vespidae | 151 | 10 | 2 | 20 | [3-56] |
| Lepidoptera | Tineidae* | 1,393 | 39(1*) | 10 (0*) | 26 | [13-42] |
| Orthoptera | Gryllidae | 5,126 | 60 | 6 | 10 | [4-21] |
| Psocoptera | | 855 | 17 | 0 | 0 | |
| Zygentoma | Lepismatidae | 144 | 9 | 1 | 11 | [0.3-48] |
| **Total (including not shown$)** | | **29,776** | **651** | **85** | **13.1** | **[10.6-15.9]** |

* Number of pools which included several families within an order$

$ See appendix table 2 for details.

**Table 3. Comparison of *M. ulcerans* detection in rural and urban areas for the positive families.**
Families positive in both sites are represented in bold. Pools mixing rural and urban specimens were excluded.

| Order | Family | % MU-positive Urban | Total pools Urban | % MU-positive Rural | Total pools Rural |
|---|---|---|---|---|---|
| Aranaea | Aranaea | 0 | 16 | 1 (8,3%) | 12 |
| **Blattaria** | **Blattidae** | **2 (7,7%)** | **26** | **3 (20,0%)** | **15** |
| Coleoptera | Other Coleoptera | 0 | 1 | 0 | 4 |
| | Scolytidae | 0 | 2 | 0 | 4 |
| | Staphylinidae | 0 | 2 | 6 (60,0%) | 10 |
| | Trogidae | 1 (50,0%) | 2 | 0 | 3 |
| Diptera | Cecidomyiidae | 5 (41,7%) | 12 | 0 | 43 |
| | Ceratopogonidae+ | 1(25,0%) | 4 | 0 | 0 |
| | Chironomidae | 4 (33,3%) | 12 | 0 | 11 |
| | **Culicidae** | **5 (18,5%)** | **27** | **4 (7,1%)** | **56** |
| | **Drosophilidae** | **1 (9,1%)** | **11** | **2 (22,2%)** | **9** |
| | Muscidae | 0 | 7 | 0 | 6 |
| | Other diptera | 0 | 3 | 0 | 4 |
| | **Psychodidae+** | **18 (42,9%)** | **42** | **1 (6,7%)** | **15** |
| | Sciaridae+ | 3 (50,0%) | 6 | 0 | 2 |
| | Tipulidae | 2 (33,3%) | 6 | 0 | 2 |
| Hemiptera | Cicadellidae | 1 (12,5%) | 8 | 0 | 10 |
| | Cydnidae | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | Delphacidae | 1 (33,3%) | 3 | 0 | 1 |
| | Lygaeidae | 1 (50,0%) | 2 | 0 | 1 |
| | Meenoplidae | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hymenoptera | Formicidae | 4 (7,3%) | 55 | 0 | 13 |
| | Vespidae+ | 0 | 1 | 2(20,0%) | 10 |
| | Other Hymenoptera | 0 | 6 | 0 | 6 |
| Isopoda | Isopoda* | 0 | 2 | 0 | 2 |
| **Lepidoptera** | **Tineidae+** | **6 (35,3%)** | **17** | **4 (18,2%)** | **22** |
| | Other Lepidoptera | 0 | 1 | 0 | 5 |
| **Orthoptera** | **Gryllidae** | **1 (12,5%)** | **8** | **5 (10,6%)** | **47** |
| Psocoptera | Psocoptera* | 0 | 12 | 0 | 5 |
| Zygentoma | Lepismatidae | 1 (33,3%) | 3 | 0 | 6 |
| **Total (Including not shown)** | | **57 (18.9%)** | **302** | **28 (8.9%)** | **326** |




**<u>Figure 1. Location and satellite view of study sites in Akonolinga BU-endemic region, Cameroon.</u>**
**Satellite images are screen captures from Google Earth.**
Figure 1A. Location of study sites in high endemic areas of Akonolinga health district (Landier).
Figure 1B. Satellite view of Akonolinga urban area. The "Quartier Lac" study neighborhood is circled in red.
Figure 1C. Satellite view of Endom rural area, 40 km south-west from Akonolinga town. Study villages are located with a red mark.

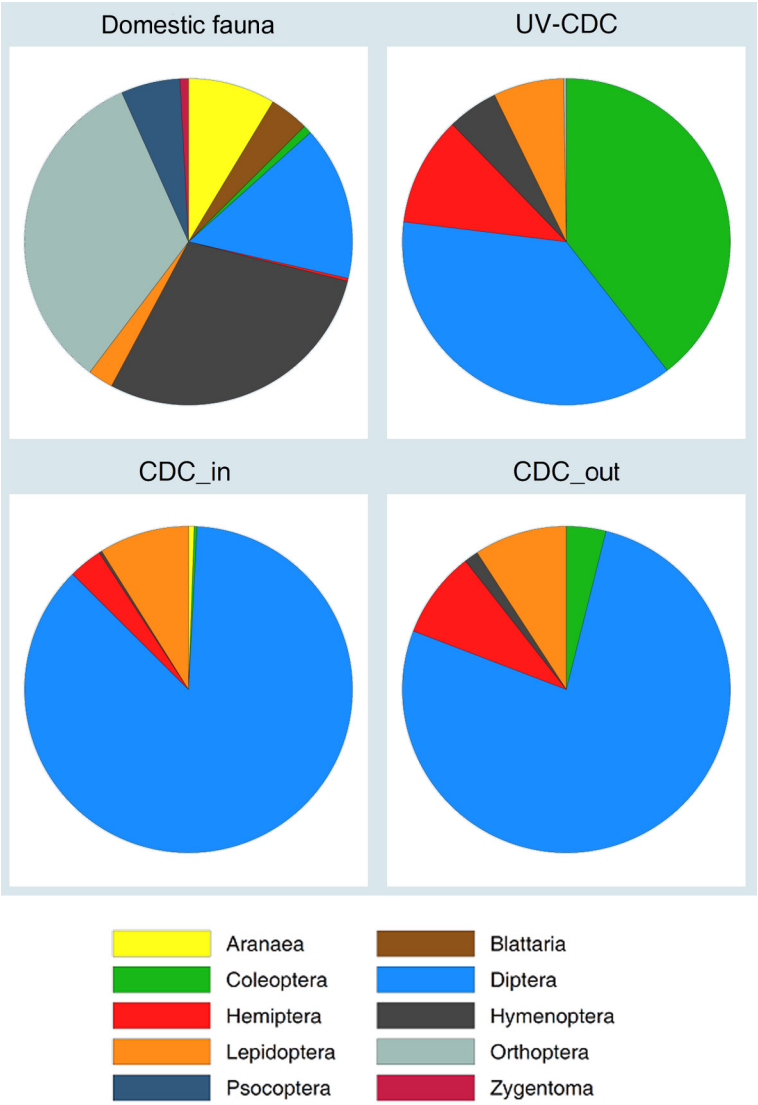



**Figure 2. Relative abundance of each of the 10 most abundant orders, by collection method used.**

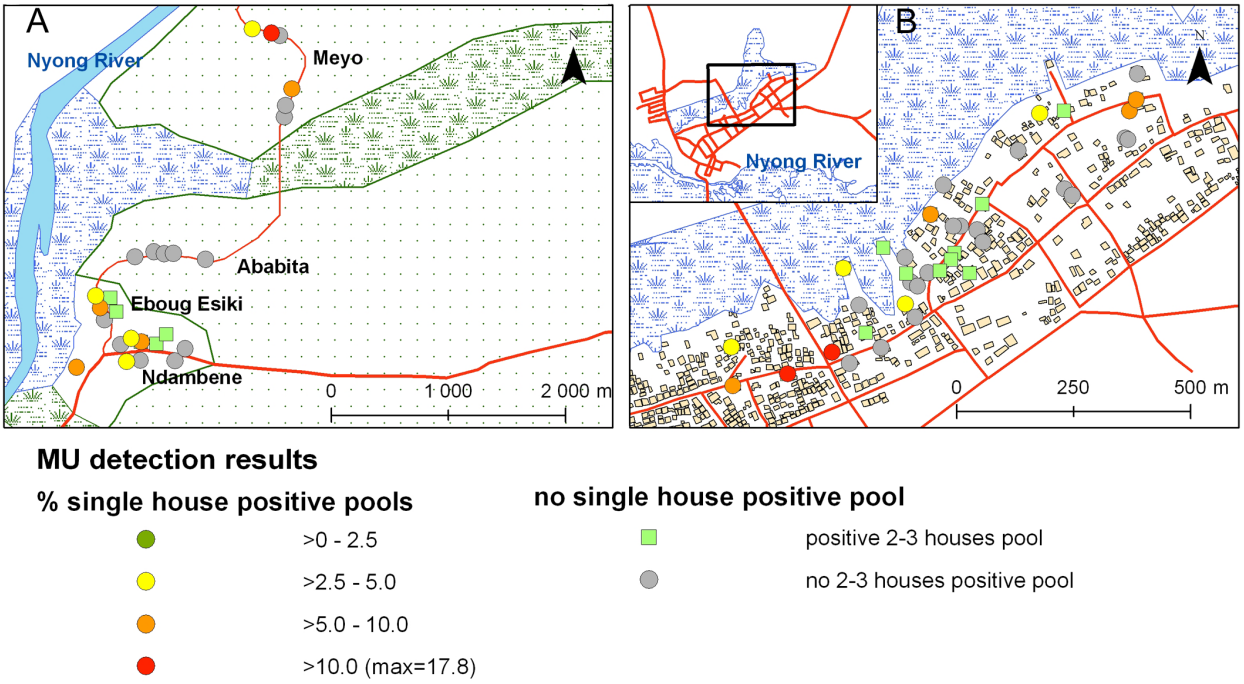



**Figure 3. Mapping the proportion of MU-positive pools at house-level.**

Figure 3A. Map for Akonolinga urban area, "Quartier Lac".

Figure 3B. Map for the four villages in Endom rural area.

**Appendix Table 1. Complete capture results (including orders where less than 100 specimen where collected**

| Order | Residual fauna | UV-CDC light-trap | Indoors CDC light-trap | Outdoors CDC light-trap | Total | % Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aranaea | 1,329 | 1 | 36 | 6 | 1,372 | 4.4 |
| Blattaria | 596 | 0 | 2 | 0 | 598 | 1.9 |
| Coleoptera | 162 | 1,181 | 37 | 180 | 1,560 | 5.0 |
| Dermaptera | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | <0.1 |
| Diptera | 2,347 | 1,127 | 6,914 | 3,759 | 14,147 | 44.9 |
| Embiidina | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | <0.1 |
| Ephemerida | 3 | 0 | 1 | 0 | 4 | <0.1 |
| Hemiptera | 40 | 328 | 276 | 418 | 1,062 | 3.4 |
| Hymenoptera | 4,481 | 147 | 21 | 77 | 4,726 | 15.0 |
| Isopoda | 51 | 0 | 0 | 0 | 51 | 0.2 |
| Isoptera | 5 | 2 | 0 | 6 | 13 | <0.1 |
| Julida | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | <0.1 |
| Lepidoptera | 372 | 215 | 700 | 443 | 1,730 | 5.5 |
| Mantodea | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | <0.1 |
| Orthoptera | 5,158 | 4 | 1 | 1 | 5,164 | 16.4 |
| Phthiraptera | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | <0.1 |
| Pseudoscorpionida | 3 | 4 | 0 | 0 | 7 | <0.1 |
| Psocoptera | 875 | 1 | 1 | 1 | 878 | 2.8 |
| Scorpionida | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | <0.1 |
| Siphonaptera | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | <0.1 |
| Trichoptera | 0 | 16 | 5 | 15 | 36 | 0.1 |
| Zygentoma | 147 | 0 | 0 | 0 | 147 | 0.5 |
| Indetermined | 6 | 1 | 0 | 2 | 9 | <0.1 |
| **Total** | **15,592** | **3,027** | **7,994** | **4,908** | **31,521** | **100** |

**Appendix Table 2: Complete PCR results, including detailed composition of mixed pools, mean and median concentration of bacteria/mL for each family with positive pools**

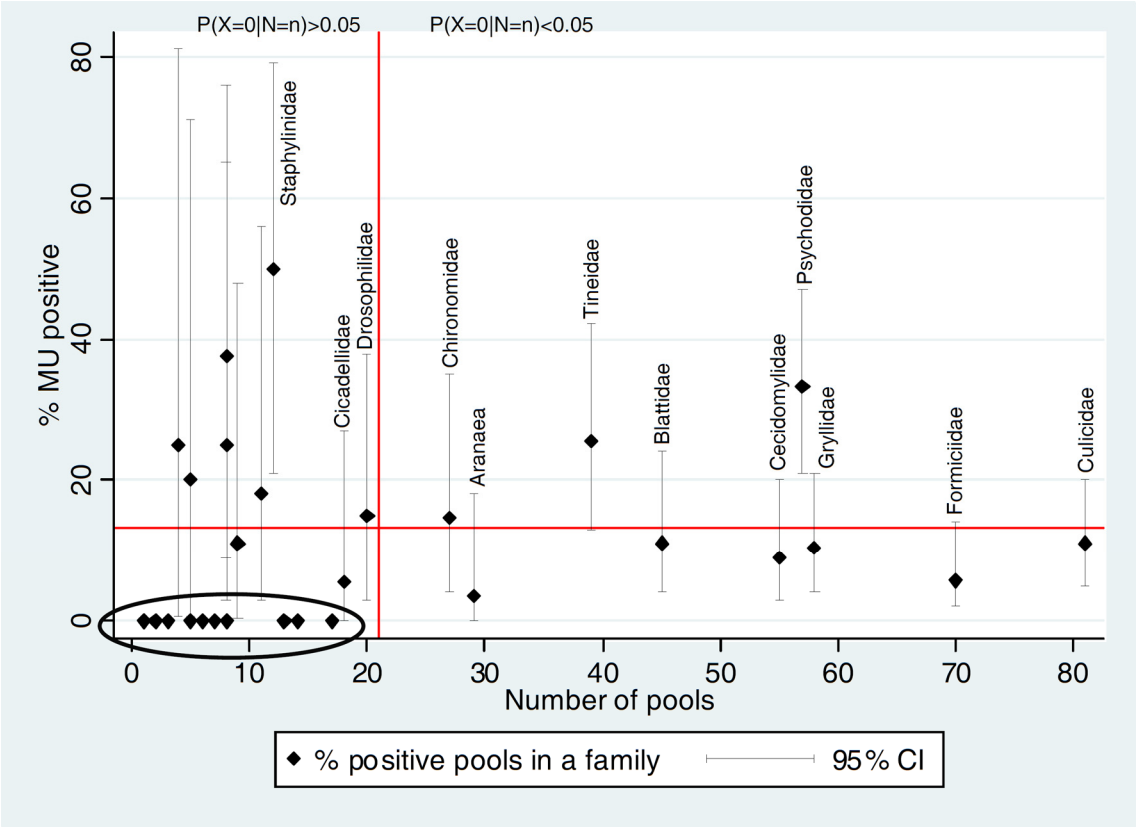
| **Order** or Family | **N specimens analyzed** | **N pools analyzed** | **N MU-positive pools** | **% positive pools** | **Mean bacteria concentra-tion (KR)** | **Median bacteria concentra-tion (KR)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Aranaea** | 1361 | 29 | 1 | 3.45 | 366.7 | 366.7 |
| **Blattaria** | 577 | 46 | 5 | 10.87 | 738.82 | 476.2 |
| **Coleoptera** | | | | | | |
| Staphylinidae | 580 | 12 | 6 | 50 | 534.3333 | 483.4 |
| Trogidae | 241 | 5 | 1 | 20 | 206.2 | 206.2 |
| Scolytidae | 112 | 6 | 0 | 0 | | |
| Other Coleoptera | 122 | 8 | 0 | 0 | | |
| **Dermaptera** | 2 | 1 | 0 | 0 | | |
| **Diptera** | | | | | | |
| Cecidomyiidae | 2724 | 55 | 5 | 9.09 | 2250.54 | 1946 |
| Ceratopogonidae | 64 | 2 | 0 | 0 | | |
| Mixed Diptera: 26 Ceratop. 2 Other | 28 | 1 | 1 | 100 | 390 | 390 |
| Mixed Diptera: 40 Ceratop. 4 Sciaridae | 44 | 1 | 0 | 0 | | |
| Chironomidae | 1234 | 26 | 4 | 15.38 | 889.5 | 720.25 |
| Culicidae | 5060 | 81 | 9 | 11.11 | 472.9222 | 450 |
| Mixed Diptera: 10 Scia 3 Chiron. 10 Ceratop. 11 Psychodidae | 34 | 1 | 0 | 0 | | |
| Mixed Diptera: 7 Sciaridae 9 Ceratop. | 16 | 1 | 0 | 0 | | |
| Drosophilidae | 1055 | 20 | 3 | 15 | 442.8 | 284.1 |
| Muscidae | 414 | 13 | 0 | 0 | | |
| Mycetophilidae | 16 | 3 | 0 | 0 | | |
| Phoridae | 24 | 4 | 0 | 0 | | |
| Mixed Diptera: 7 Phoridae 1 Psychodidae | 8 | 1 | 0 | 0 | | |
| Psychodidae | 2652 | 55 | 19 | 34.55 | 962.7789 | 510 |
| Mixed Diptera: 14 Psychodidae 1 Ceratop. 1 Phoridae | 16 | 1 | 0 | 0 | | |
| Mixed Diptera: 33 Psychodidae 1 Phoridae | 34 | 1 | 0 | 0 | | |
| Sciaridae | 224 | 6 | 3 | 50 | 2451 | 2895 |
| Mixed Diptera: 58 Sciaridae 5 Ceratopogonidae | 63 | 1 | 0 | 0 | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mixed Diptera: 2 Ceratop. | | | | | | |
| 26 Sciaridae 2 other | 30 | 1 | 0 | 0 | | |
| Tipulidae | 176 | 8 | 2 | 25 | 2559 | 2559 |
| **Hemiptera** | | | | | | |
| Cicadellidae | 658 | 18 | 1 | 5.56 | 357.3 | 357.3 |
| Cydnidae | 9 | 2 | 0 | 0 | | |
| Delphacidae | 63 | 4 | 1 | 25 | 232.1 | 232.1 |
| Lygaeidae | 58 | 4 | 1 | 25 | 367.8 | 367.8 |
| Meenoplidae | 47 | 1 | 0 | 0 | | |
| **Hymenoptera** | | | | | | |
| Formicidae | 4076 | 70 | 4 | 5.71 | 1105.7 | 663.6 |
| Vespidae | 151 | 10 | 2 | 20 | 421.85 | 421.85 |
| 2Vespidae+2Sphecidae | 4 | 1 | 0 | 0 | | |
| Other Hymenoptera | 97 | 14 | 0 | | | |
| **Isopoda** | 51 | 5 | 0 | 0 | | |
| **Isoptera**: Termitidae | 8 | 1 | 0 | 0 | | |
| **Lepidoptera** | | | | | | |
| Tineidae | 1362 | 38 | 10 | 26.32 | 413.29 | 361.4 |
| 31 Tineidae + 4 Pyralidae | 35 | 1 | 0 | 0 | | |
| Pyralidae | 87 | 2 | 0 | 0 | | |
| Other Lepidoptera | 36 | 5 | 0 | | | |
| **Orthoptera**: Gryllidae | 5126 | 60 | 6 | 10 | 2826 | 494.05 |
| **Psocoptera** | | | | | | |
| Psocidae+Lepidopsocidae | 499 | 10 | 0 | 0 | | |
| Psocidae | 356 | 7 | 0 | 0 | | |
| **Zygentoma**: Lepismatidae | 144 | 9 | 1 | 11.11 | 742.4 | 742.4 |

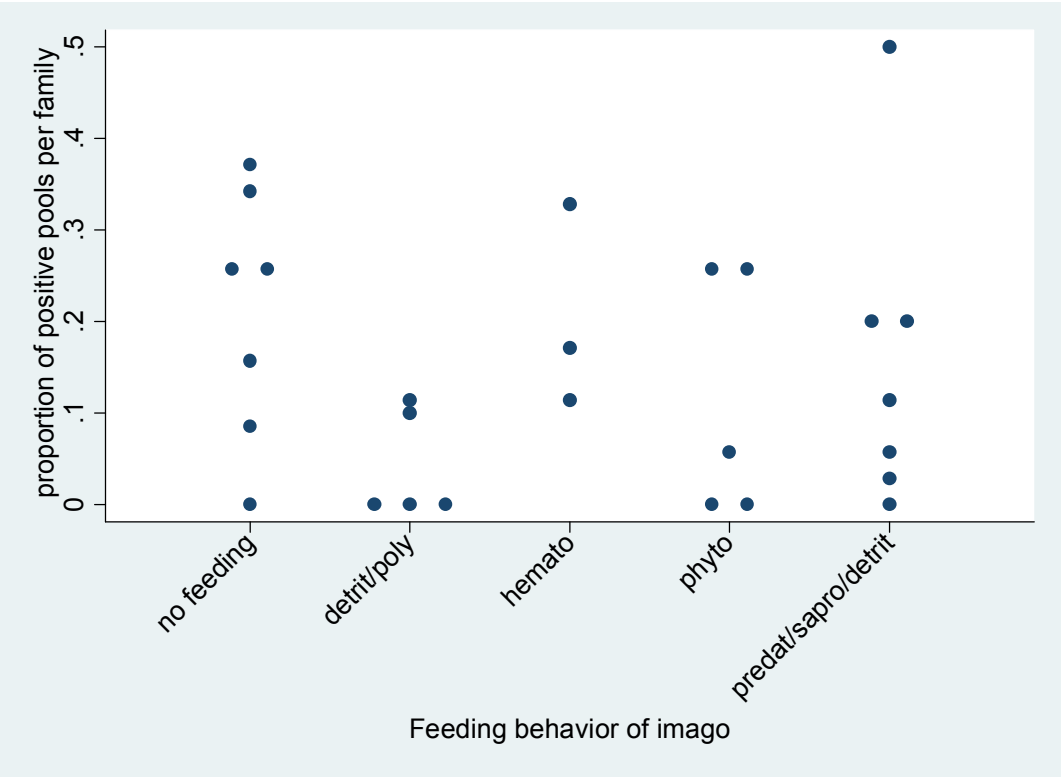
**Appendix Table 3: ecological characteristic of the main taxa collected (n>100)**

| order | family | N specim. | N pools | N pool+ | Imago feeding | Larva feeding | Imago habitat | Larva habitat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aranaea | | 1361 | 29 | 1 | predator | predator | in/outdoor | in/outdoor |
| Blattaria | Blattidae | 577 | 46 | 5 | saprophagous | saprophagous | indoor | indoor |
| Coleoptera | Staphylinidae | 580 | 12 | 6 | predator | predator | mostly outdoor | mostly outdoor |
| | Trogidae | 241 | 5 | 1 | saprophagous | saprophagous | outdoor | outdoor |
| Diptera | Cecidomyiidae | 2724 | 55 | 5 | no feeding | phytophagous | outdoor | outdoor/ on leaves |
| | Ceratopogonidae* | 130 | 6 | 1 | hematophagous | polyphagous | anthropo-philic | soil |
| | Chironomidae | 1234 | 26 | 4 | no feeding | filter-feeding | outdoor | aquatic |
| | Culicidae | 5060 | 81 | 9 | hematophagous | predator | anthropo-philic | aquatic |
| | Drosophilidae | 1055 | 20 | 3 | phytophagous | phytophagous/ saprophagous | anthropo-philic | outdoor in fruits |
| | Muscidae | 414 | 13 | 0 | polyphagous | saprophagous | in/outdoor | in/outdoor |
| | Psychodidae* Phlebo$ | 768 | 15 | 5 | hematophagous | | indoor | aquatic |
| | Psychodidae* Autres$ | 1943 | 38 | 13 | no feeding | | outdoor | aquatic |
| | Sciaridae* | 308 | 8 | 3 | no feeding | saprophagous/ coprophagous | outdoor | soil |
| | Tipulidae | 176 | 8 | 2 | no feeding? | saprophagous | outdoor | soil |
| Hemiptera | Cicadellidae | 658 | 18 | 1 | phytophagous | phytophagous | outdoor | outdoor |
| | Delphacidae | 63 | 4 | 1 | phytophagous | phytophagous | outdoor | outdoor |
| | Lygaeidae | 58 | 4 | 1 | phytophagous | phytophagous | outdoor | outdoor |
| Hymenoptera | Formicidae | 4076 | 70 | 4 | predator/ detritivorous | colonial | in/outdoor | colony |
| | Vespidae | 151 | 10 | 2 | predator/ saprophagous | colonial | outdoor | indoor |
| Lepidoptera | Tineidae* | 1393 | 39 | 10 | no feeding? | detrivorous | indoor | indoor |
| Orthoptera | Gryllidae | 5126 | 60 | 6 | polyphagous | polyphagous | indoor | indoor |
| Psocoptera | Psocoptera+ | 855 | 17 | 0 | detritivorous | detrivorous | indoor | indoor |
| Zygentoma | Lepismatidae | 144 | 9 | 1 | detritivorous | detrivorous | indoor | indoor |
| Lepidoptera | Pyralidae | 92 | 2 | 0 | sweet liquid or no feeding | phytophagous | outdoor | outdoor |
| Hemiptera | Meenoplidae | 89 | 1 | 0 | phytophagous | phytophagous | outdoor | outdoor |
| Coleoptera | Chrysomelidae | 60 | 1 | 0 | phytophagous | phytophagous | outdoor | outdoor |
| Coleoptera | Anthicidae | 54 | 1 | 0 | predator/ saprophagous | predator/ saprophagous | outdoor | outdoor |
| Isopoda | | 51 | 5 | 0 | detritivorous/ polyphagous | detritivorous/ polyphagous | outdoor | outdoor |

$ 7 pools, including 1 MU-positive, mixed both Phlebotominae and other subfamilies of Psychodidae and are not presented here




**Appendix Figure 1. Percentage of MU-positive pools as a function of the number of pools analyzed.** Vertical capped bars represent exact binomial 95% confidence intervals of percentage estimates. (see Table 2).




**<u>Appendix Figure 2. Proportion of MU positive pools found across the different taxa according to adult feeding behaviors.</u>** detrit/poly=detritivorous and polyphagous; hemato=hematophagous; phyo=phytophagous; predat/sapro/detrit=predators and/or saprophagous + predator and detritivorous.

# Chapitre 5 : Discussion

## 1. Progression du niveau de connaissances et du niveau de preuve sur les objectifs

Nous proposons tout d'abord une tentative d'évaluation succincte du niveau de preuve pour les connaissances détaillées au chapitre 1 dans le domaine de l'épidémiologie et de la biologie de terrain (présence de MU dans l'environnement). L'objectif est de mettre en perspective la contribution apportée par ce travail. Une tentative d'évaluation des niveaux de preuve des hypothèses de transmission par la biologie du laboratoire est également proposée pour permettre d'évaluer le niveau de preuve de chaque mécanisme de transmission. Pour l'épidémiologie, le niveau de preuve sera évalué selon le système Evidence-Based Medecine mis au point par la Haute Autorité de Santé (Tableau 5.1) et on indiquera aussi l'existence d'une réplication d'un résultat, qui permet d'en renforcer le niveau de preuve [147]. Il faut également tenir compte du domaine particulier auquel on tente d'appliquer ces critères : la fragilité des études cas-témoins (chapitre 5, partie 2.1), la réalisation d'études comparatives dont l'unité d'analyse est le village (auxquelles on peut prétendre attribuer des niveaux de preuve allant jusqu'à 2), ou d'études longitudinales de forte puissance.

Pour la biologie de terrain, on utilisera également un codage de 1 à 4 par ordre de niveau de preuve décroissant et on attribuera 5 à l'absence d'étude.

On gardera également à l'esprit les critères énoncés par Hill pour tenter d'évaluer l'existence d'une causalité à partir d'une association : force de l'association, sa reproductibilité, sa spécificité, sa chronologie, l'existence d'une relation dose-effet, la plausibilité biologique et sa cohérence, la possibilité de tester cette association par des expérimentations au laboratoire, et enfin l'existence de situations analogues.

**Tableau 5.1 Grille proposée pour l'évaluation du niveau de preuve.**

| Niveau | Epidémiologie [148] | Biologie de terrain |
|---|---|---|
| 1 | Essais comparatifs randomisés de forte puissance<br>Méta-analyse d'essais comparatifs randomisés<br>Analyse de décision fondée sur des études bien menées | Démonstration formelle d'une transmission, association entre détection de positifs dans l'environnement et incidence d'UB |
| 2 | Essais comparatifs randomisés de faible puissance<br>Etudes comparatives non randomisées bien menées<br>Etudes de cohortes | Détection de positifs dans des études incluant les variations spatiales et temporelles et des comparaisons entre zones endémiques et non endémiques |
| 3 | Etudes cas-témoins | Détection répétée de positifs dans des sites différents, avec échantillonnages importants |
| 4 | Etudes comparatives comportant des biais importants<br>Etudes rétrospectives<br>Séries de cas<br>Etudes transversales | Détection de positifs par des études avec faible échantillonage |
| 5 | | Absence d'étude |

## 1.1 Facteurs de risque individuels, spatiaux et temporels

Ce travail a été l'occasion de répliquer dans d'autres contextes plusieurs résultats mis en évidence précédemment, et d'en renforcer ainsi le niveau de preuve (Tableau 5.2).

Des taux d'incidence par classe d'âge et par sexe n'avaientt été rapporté jusqu'à présent que par deux études, en Ouganda dans les années 70 et au Bénin (Figure 1.2). Notre contribution indique que les mêmes tendances en termes de classes d'âge sont retrouvées dans deux foyers d'Afrique Centrale, ce qui conforterait l'hypothèse d'une exposition croissante à partir de 5 ans avec l'acquisition d'une certaine immunité. L'incidence accrue chez les personnes âgées suggère la possibilité de réactivations d'une infection latente ou de nouvelles infections suite à une diminution de l'immunité avec l'âge. Les différences entre hommes et femmes ne se retrouvent pas toujours entre les résultats du Bénin, et des deux régions camerounaises de Bankim et Akonolinga. Ces variations traduisent probablement des différences locales dans les comportements et les activités.

Le niveau de preuve initial est évalué à 3 car l'association avait été démontrée sur des études transversales (Bénin, Ghana) et une étude cas-témoins non appariée [57]. Le niveau de preuve final reste à 3, avec la généralisation des tendances observées pour l'âge à deux autres foyers dans une troisième région (Afrique Centrale), et la mise en évidence de variations liées au sexe.

L'analyse de la cohorte de patients d'Akonolinga, combinée avec des données géographiques et démographiques sur le district de santé, a permis d'effectuer une analyse quantitative de facteurs de risque géographiques dont le niveau de preuve était jusqu'à présent faible, reposant sur des arguments indirects ou des avis d'experts. Elle a également permis de tester à l'échelle régionale des associations spatiales précédemment décrites au niveau national. Le niveau de preuve initial du rôle des fleuves peut être évalué entre 4 et 3. Il a été observé dans la plupart des régions endémiques africaines, mais il n'a été estimé que de façon indirecte dans les études cas-témoins ou des études de corrélation. De même les environnements à risque n'ont été caractérisés qu'à des échelles très larges (pays entier). Les éléments environnementaux (urbanisation, forêt) ont été étudiés sur des surfaces vastes (20km de rayon=1200km² autour d'un centre de santé) et les associations ainsi mises en évidence à l'échelle du pays entier ne sont pas forcément pertinentes localement. Le niveau de preuve initial était donc de 4. Certains éléments pourtant couramment associés à la distribution spatiale de l'UB, ne l'étaient que de façon indirecte : le rôle des zones marécageuses était évalué par des études individuelles ou transversales, et le rôle de la déforestation relevait de l'avis d'experts, mais pas d'une démonstration formelle.

Notre étude comparative sur un grand nombre de cas et de villages permet de mettre en évidence une relation dose-effet entre incidence et proximité du fleuve Nyong (gradient de risque croissant), d'évaluer la distance limite de son influence (environ 10 km) et d'identifier des variations de niveau de risque le long du fleuve. Un même motif est identifiable au Bénin dans la région de Pobè (Encadré 3.1). Ainsi notre travail permet d'atteindre un niveau de preuve supérieur et de remplir plusieurs critères de causalité selon Hill [56]. Notre analyse de paysages, si elle ne permet pas de quantifier l'effet de chaque variable utilisée pour décrire les paysages, permet d'identifier les ensembles de caractéristiques environnementales associés à des risques élevés. En combinant distance au fleuve et environnement, elle permet d'apprécier le rôle joué par chaque facteur. Nous montrons ainsi que le risque d'UB diminue dans les zones où la forêt est préservée, et que les marécages, en particulier cultivés, occupent une surface importante dans les zones à haut risque.

De même, en termes de périodes à risque, si l'existence d'une saisonnalité a été postulée à quelques reprises, aucune démonstration formelle n'avait été effectuée et le niveau de preuve était donc celui, fortement débattu, de l'avis d'expert. Nos travaux, conjugués à des travaux menés en Guyane, et appuyés par d'autres travaux à venir associant incidence des cas cliniques et prévalence de MU dans l'environnement [149], donnent des arguments pour un niveau de preuve 3 (Tableau 5.2).

## 1.2 Hypothèses concernant le réservoir et la transmission de MU

On peut également s'intéresser aux facteurs de risque épidémiologique sous l'angle des informations qu'ils donnent sur un possible mécanisme de transmission. Un nombre important d'études cas-témoins a été réalisé et le niveau de preuve des différents facteurs de risque (soins des blessures, port de vêtements) est évaluable à 3, le niveau de preuve étant supérieur pour les facteurs de risque ayant été mis en évidence lors de plusieurs études. L'étude cas-témoin réalisée à Bankim a permis de montrer que l'association entre utilisation d'une moustiquaire et risque diminué d'UB était reproductible. Le niveau de preuve final reste à 3, renforcé par la réplication.

Par ailleurs, le travail ultérieur d'entomologie a permis l'identification de la présence de MU dans l'environnement domestique, ainsi que de possibles candidats vecteurs également positifs pour MU. Ces travaux à grande échelle ont permis de confirmer en Afrique l'existence de moustiques positifs comme décrit en Australie, mais également de fournir une vue d'ensemble des taxons positifs dans l'environnement domestique. Le niveau de preuve initial concernant l'existence d'une chaîne de transmission terrestre en Afrique peut être estimé à 5, car toutes les données en faveur de cette hypothèse provenaient d'Australie, et impliquaient des marsupiaux, animaux endémiques qui n'existent pas en Afrique. Le niveau de preuve atteint par les études australiennes reste faible, à 4, car limité à l'échantillonnage de 2 taxons. Le niveau de preuve final peut être estimé à 3, par l'exhaustivité du travail de collecte et d'évaluation de la présence de MU.

Au laboratoire, l'étude d'une possible transmission par les moustiques n'a été rapportée que dans un article qui donne des résultats négatifs (niveau de preuve 4). Davantage de données et d'expériences sont cependant nécessaires pour conclure (nombre d'individus, choix des espèces). A titre de comparaison, le rôle des Hémiptères aquatiques dans la transmission, s'il est clairement démontré sur le plan biologique au laboratoire et bien documenté sur le terrain avec des captures multiples d'Hémiptères aquatiques positifs en PCR et l'isolement de MU à partir de spécimens issus des zones endémiques (niveau de preuve 1), n'est soutenu que par des arguments très indirects au niveau épidémiologique (niveau de preuve 4).

**Tableau 5.2 : Tentative d'évaluation du niveau de preuve de quelques facteurs de risque et hypothèses de transmission, et de la contribution du présent travail.**

| | Niveau de preuve initial | | Niveau de preuve final | |
|---|---|---|---|---|
| | Epidémiologie | Biologie terrain | Epidémiologie | Biologie terrain |
| Facteurs de risque | | | | |
| Groupes démographiques à risque | 3 | | 3, réplication | |
| Environnements à risque | 4 (national) | | 3 (régional) | |
| Distance au fleuve | 3 | | 2 | |
| Marécages | 4 | | 3 | |
| Zones déforestées | Avis d'expert | | 3 | |
| Périodes à risque | Avis d'expert | | 3, répliqué en Guyane | |
| | | | | |
| Hypothèses de transmission | | | | |
| Rôle possible des insectes aquatiques dans la transmission | 4 | 1 | 4 | 1 |
| Rôle possible des insectes domestiques | 3 | 4 (Australie)<br>5 (Afrique) | 3, réplication (moustiquaire) | 3 |
| Transmission directe via des lésions pré-existantes | 3 | 4 | 3, réplication (hygiène des plaies) | 4 |
| Existence d'un réservoir terrestre | 4 | 3 (Australie)<br>5 (Afrique) | 4 | 3 (Australie)<br>4 (Afrique) |

## 2. Discussion sur les approches et les outils utilisés

### 2.1 En épidémiologie

#### *2.1.1 Les intérêts et les limites des analyses rétrospectives*

##### 2.1.1.1 Les études cas-témoins

Les facteurs de risque d'UB associés aux caractéristiques et aux comportements individuels ont été étudiés par des études cas-témoin. Ces études rétrospectives sont l'outil de choix pour étudier une maladie relativement rare telle que l'UB, car il suffit de disposer d'un nombre suffisant de cas inscrits dans un registre (ici enregistrés à l'hôpital qui les a traités) pour les interroger a posteriori sur leurs expositions aux différents facteurs de risque, et faire de même pour des témoins tirés au sort parmi la population qu'on estime être la source des cas (Chapitre 1). Disposer d'un nombre suffisant de cas, être capable de les retrouver et de mener les enquêtes est une contrainte faible au regard de la logistique qu'il faudrait déployer pour suivre une cohorte suffisamment nombreuse pour espérer en tirer des conclusions.

Cependant, ces études reposent sur une hypothèse forte qui est soumise à caution. Lorsqu'on analyse les facteurs de risque d'UB, on recherche implicitement les activités et comportements qui diffèrent entre les cas et les témoins, et qui auraient donc mis les cas en contact avec MU et permis l'infection. Schématiquement, cela revient à considérer que les cas ont été exposés à MU, mais pas les témoins. Si la définition des cas est claire, et leur exposition indéniable au vu de l'infection, la non-exposition des témoins n'est évaluée que de façon indirecte par l'absence de symptômes. Or, cette absence de symptômes peut certes traduire l'absence d'exposition, mais aussi l'existence de mécanismes, immunitaires ou autres, ayant permis d'éviter l'infection, ou bien l'existence d'une infection latente n'ayant pas (encore ?) de manifestations cliniques. Des mécanismes de susceptibilité génétique ont été démontrés pour *M. tuberculosis* et *M. leprae* ; *M. tuberculosis* et d'autres mycobactéries atypiques sont aussi des infections opportunistes qui surviennent suite aux déficiences du système immunitaire. Des facteurs génétiques associés à une sévérité particulière ont été identifiés [9], et une étude de grande ampleur est en cours au Bénin.

L'hypothèse d'une exposition à MU allant au-delà des cas d'UB en zone endémique semble confirmée par des travaux qui montrent qu'une proportion variable d'individus asymptomatiques, habitant des zones endémiques (parents des cas d'UB ou non apparentés) présente une réponse immunitaire anti-MU, impliquant immunité cellulaire et immunité humorale [12,13,150].

##### 2.1.1.2 L'analyse de longues séries de cas

Une partie importante de ce travail de thèse repose sur l'analyse de la cohorte de patients traités pour l'UB à l'Hôpital d'Akonolinga, dont le diagnostic était effectué au Service de Mycobactériologie

du Centre Pasteur du Cameroun et le traitement pris en charge par Médecins Sans Frontières-Suisse. Cette cohorte, avec celle du CDTUB à Pobè, au Bénin, fait partie des rares séries qui conjuguent plus de 10 ans de suivi avec un nombre conséquent de cas (environ 800), en particulier confirmés biologiquement (65%), et une caractérisation suffisamment précise de l'origine des cas au sein d'une région endémique en Afrique.

Ces séries de cas peuvent être utilisées pour des analyses sur les caractéristiques cliniques des cas, et la comparaison des cas entre eux à condition que les informations recueillies soient suffisamment homogènes et bien renseignées au cours du temps [22,151]. L'exploitation de ces séries en relation avec la population générale nécessite d'obtenir des estimations sur la population source des cas. Nos analyses ont pu être réalisées grâce aux données géographiques de localisation des 170 villages dans la zone d'Akonolinga, aux données de populations par hameau et aux données de population par sexe, par âge et par arrondissement obtenues auprès du Bureau du recensement du Cameroun (BUCREP). Enfin, leur périodicité mensuelle nous a permis de nous intéresser aux variations saisonnières de l'incidence, dans une zone géographique bien déterminée.

### ***2.1.2 Une tentative d'étude prospective***

L'outil épidémiologique dont le manque se fait sentir pour l'ulcère de Buruli est le suivi prospectif d'une cohorte d'individus dont on documenterait les activités pour étudier leur association à la survenue de nouveaux cas. L'incidence maximale est de quelques cas pour 100 personnes.années dans de petits villages. Si l'on considère l'incidence d'UB de 2 cas pour 1000 personnes.années calculée dans la zone à haut risque d'Akonolinga (Chapitre 3), il faudrait suivre la totalité des 25000 habitants de la zone à haut risque durant 2 ans pour disposer d'une taille d'échantillon permettant de vérifier un éventuel effet protecteur de l'utilisation d'une moustiquaire (50% d'utilisateurs, Odds Ratio=0,5 [58,141]).

Au cours de cette thèse, nous avons travaillé sur la possibilité de détecter les événements d'exposition à MU chez des individus asymptomatiques vivant en zone endémique plutôt que de suivre l'apparition de cas cliniques d'UB. Cette possibilité était envisagée grâce aux travaux mentionnés plus haut sur la mesure d'une réponse immunitaire contre MU chez des individus asymptomatiques vivant en zone endémique. Nous avons privilégié l'étude de la réponse anticorps, plus simple et pour laquelle quelques travaux ont pu servir de base [13,15,150]. La réponse cellulaire n'avait été évaluée sur le terrain qu'au moyen de la Buruline, un analogue de la tuberculine non standardisé utilisé en Ouganda dans les années 70 [152] et pour la dernière fois en Côte d'Ivoire dans les années 90 [12].

L'approche initialement développée en Australie consistait à rechercher dans le génome de MU des séquences codantes spécifiques de MU, à les exprimer in vitro et à tester l'existence d'une réponse immunitaire contre ces antigènes dans le sérum d'individus ayant été exposés ou non à MU [14]. Sur la base de ces résultats, nous avons réalisé deux séries d'expériences, en utilisant des sérums en provenance des zones endémiques de Bankim et Akonolinga au Cameroun, et de Pobè au Bénin, ainsi que des sérums provenant de régions du Bénin où l'UB est beaucoup moins fréquent. L'analyse des réponses anticorps des cas d'UB et des témoins issus de zones endémiques ou issus de zones non endémiques n'a pas permis de définir des seuils en deçà ou au-delà desquels on aurait pu définir de façon fiable si un individu asymptomatique avait été exposé ou non. L'absence d'un « gold standard » pour définir des individus exposés et non-malades n'a pas non plus permis de travailler sur des groupes de témoins précisément caractérisés.

## 2.2 En entomologie

### *2.2.1 Un effort d'échantillonnage inégalé*

Le projet ANR EXTRA-MU, sur lequel s'est déroulé une partie du travail de cette thèse, a permis de fournir un effort considérable dans l'échantillonnage des environnements à risque à la recherche de MU. Ces collectes mensuelles portant sur la totalité des taxons échantillonnés dans divers points d'eau ou dans les maisons pendant une durée d'un an représentent un travail d'une précision et d'une exhaustivité encore jamais atteinte : au cours des 3 premiers mois, plus de 30000 spécimens appartenant à 123 groupes taxonomiques distincts ont été collectés. Les résultats de cet échantillonnage n'en sont qu'au début de leur exploitation ; et le tri des échantillons de l'environnement domestique n'est même pas encore terminé (plus de 100 000 insectes déjà triés, environ 50000 analysés en qPCR). Les premiers résultats permettent déjà de proposer des pistes nouvelles pour les recherches de terrain et au laboratoire. Ils permettent aussi d'améliorer considérablement les interprétations des résultats épidémiologiques, spatialisés et/ou temporels, sur l'incidence de l'UB et permettent la construction de divers modèles de niche écologique et de transmission.

Les échantillons collectés pour étudier la présence de MU dans l'environnement domestique fourniront une source de données précieuses à l'issue de leur analyse, à la fois sur MU, sa répartition parmi les Arthropodes terrestres selon les milieux, les saisons, et les types de maisons, mais aussi en terme d'entomologie pure pour décrire la faune des Arthropodes des maisons. D'autres exploitations seront également possibles, à la recherche d'autres pathogènes qui pourraient être présents dans l'environnement domestique par exemple.

### *2.2.2 La nécessité d'aller au-delà de la PCR pour l'identification de MU*

L'analyse PCR des échantillons est actuellement la méthode de référence pour la détection de MU dans l'environnement. En effet, la culture est extrêmement difficile, du fait de la lenteur de croissance de la bactérie : seules trois souches ont été isolées à partir de l'environnement depuis les années 2000, dont deux n'ont pas pu être maintenues [92,93].

Cette méthode, malgré toutes les précautions prises pour s'assurer de sa spécificité, permet de détecter uniquement l'ADN de MU. Nous ne savons donc pas si ce que nous détectons correspond à des bactéries MU vivantes, mortes, ou à de simples fragments. De même, la détection sur des échantillons broyés entiers ne permet pas de distinguer la localisation de MU dans l'échantillon : superficiel, interne, sur quelle partie du corps ou dans quel organe…

Ces questions sont importantes à résoudre afin de préciser le rôle des différents taxons identifiés comme positifs, que ce soit dans l'environnement terrestre ou dans l'environnement aquatique. L'une des possibilités en cours d'investigation est d'effectuer des coupes d'insectes dont on pense qu'ils peuvent être positifs, puis de colorer ces coupes afin de pouvoir visualiser les mycobactéries en microscopie optique et en identifier précisément la localisation.

### *2.2.3 L'analyse des liens de parenté génétique entre les MU des différents compartiments*

De même que la détection moléculaire de MU ne permet pas de savoir les détails de sa présence sur, ou dans, un échantillon positif, on n'est pour l'instant pas en mesure d'évaluer si les bactéries MU détectées dans les échantillons environnementaux sont les mêmes que celles qui sont responsables de l'UB chez les habitants des zones endémiques. Etablir les relations phylogénétiques entre les MU transportés par différents hôtes permettrait de mieux comprendre leur circulation. De plus, l'identification d'organismes de l'environnement porteurs des souches pathogènes pour l'être humain serait un progrès considérable pour faire le tri parmi les multiples organismes détectés positifs par qPCR. Cela permettrait ainsi de reconstituer la chaîne de transmission et d'identifier le ou les réservoirs, le ou les éventuels vecteurs des souches de MU responsables de l'UB.

## 3. Impact en santé publique des résultats obtenus

L'une des originalités du présent travail consiste en la combinaison d'approches dans le but de définir de manière relativement précise les circonstances à risque dans une région endémique, ici le foyer d'Akonolinga au centre du Cameroun. Ces circonstances à risque font la synthèse d'éléments déjà décrits de façon indépendante dans des études séparées et des contextes différents. Elles consistent en la définition de populations, d'environnements et de périodes à risque, ou « HotPops », « HotSpots », et de « HotPeriods ». La connaissance de la répartition des risques est un outil majeur

pour élaborer une stratégie de santé publique, en particulier lorsqu'il est nécessaire de décider de l'allocation de ressources limitées.

### 3.1 Risque d'ulcère de Buruli et stratégies de détection et de traitement précoce

Les populations à risque sont les habitants des villages en bordure du fleuve (jusqu'à 10km environ), tout particulièrement dans les zones de forêt et de marécages dégradés, en particulier défrichés pour leur mise en culture. Parmi cette population, les enfants entre 5 et 15 ans (en particuliers garçons), les femmes adultes et les personnes âgées sont les groupes démographiques à cibler en priorité. De plus, la période à haut risque correspondrait aux mois d'Aout à Octobre, durant la « grande saison des pluies », au maximum d'inondation du fleuve Nyong.

Ces résultats sont exploitables directement dans la zone d'Akonolinga afin de mettre en œuvre la stratégie recommandée par l'OMS de diagnostic et de traitement précoce des cas d'UB : dans les mois suivant la saison des pluies, l'effort de dépistage pourrait être accru dans les villages en bordure du fleuve, en visant tout particulièrement les populations à risque. Le dépistage en milieu scolaire est envisageable, mais risque de ne pas toucher les individus les plus à risque, comme les garçons de 10 à 15 ans qui préfèrent la pêche à l'école (T. Giles-Vernick, communication personnelle).

On peut envisager d'intégrer ces résultats dans l'interrogatoire de patients se présentant avec une suspicion de forme précoce d'UB. L'utilisation d'un score clinique pour le diagnostic de l'UB est en cours d'évaluation à l'hôpital de district d'Akonolinga. Y inclure des notions spatiales et temporelles pourrait permettre de l'améliorer, de même qu'une prise en compte plus importante de l'âge et du sexe, et peut-être l'inclusion de renseignements sur la pratique d'activités à risque.

Ces résultats sont faciles à généraliser dans le district voisin d'Ayos, en amont d'Akonolinga sur le fleuve Nyong, et, moyennant une adaptation aux contextes locaux, devraient pouvoir guider les stratégies dans d'autres foyers endémiques comme celui du Ouèmé au Bénin, où la dynamique et l'influence du fleuve sur le risque sont similaires, et où le climat présente également une alternance de saison sèche et de saison des pluies.

### 3.2 L'utilisation de zones à risque pour guider une décentralisation du traitement

A moyen terme, dans la perspective d'une décentralisation du traitement, un impact maximum pourrait être obtenu en ciblant 4 centres de santé sur les 17 que compte le district : Abem, Nlobolé, Edjom et Djoudjoua, qui desservent les zones à risque. Ces centres pourraient effectuer le suivi des lésions et les pansements, tandis que le futur traitement par voie orale serait dispensé de manière supervisée par un agent relais communautaire formé à l'administration de ce traitement. Limiter la

durée d'hospitalisation et diminuer la contrainte de déplacements fréquents à l'hôpital ou au Centre de Santé sont parmi les moyens les plus simples d'augmenter le recours au traitement : malgré la gratuité, l'hospitalisation est coûteuse pour les familles et les déplacements ne sont pas forcément pris en charge. Par ailleurs, une méfiance existe vis-à-vis de l'hôpital qui a, par exemple, la réputation d'être responsable des amputations.

### 3.3 Transmission, facteurs de risque et stratégies de prévention

La meilleure base pour établir une stratégie de prévention serait de connaitre précisément le mode de transmission de MU, ce qui permettrait d'en « décomposer » la chaîne et d'identifier les maillons où des actions permettrait d'agir le plus efficacement possible sur la transmission.

Les outils dont on disposait au début de ce travail étaient, au Cameroun, de recommander l'utilisation d'une moustiquaire, le port de vêtements longs lors des activités au champ, et un nettoyage approprié des blessures.

Une première précision consisterait à cibler, en parallèle de la recherche des cas, certains messages de prévention vers les groupes les plus à risque : garçons entre 5 et 15 ans, femmes entre 15 et 40 ans, personnes âgées, habitant les villages en bordure du fleuve. Une deuxième précision serait d'accentuer les recommandations avant la période à haut risque, durant par exemple le début de la saison des pluies, ou d'insister sur les risques associés aux travaux de culture des marécages. D'autre part, les progrès à attendre dans les prochaines années en termes de caractérisation de la présence de MU dans l'environnement devraient permettre d'améliorer la précision de ces messages rapidement.

## 4. Impact sur la compréhension de l'ulcère de Buruli

### 4.1 La caractérisation de l'émergence dans le foyer de Bankim

Les travaux menés sur le terrain dans la zone de Bankim à partir de 2009 ont permis de mieux appréhender l'épidémiologie et les facteurs de risque associés dans cette zone d'émergence. Cette région a été profondément modifiée par la construction du barrage de la Mappé entre 1985 et 1988. La construction d'ouvrages hydrologiques a été associée à l'augmentation des cas d'UB en Afrique de l'Ouest, et pourrait avoir contribué à l'émergence de l'UB à Bankim. Cependant, plus de 15 ans se sont écoulés entre la mise en eau du barrage et l'apparition des premiers cas. La distribution spatiale des cas, étudiée par la suite (Encadré 1.1), n'est pas homogène sur le pourtour du barrage : les cas sont concentrés dans la partie Sud du district entre le barrage et la rivière Mbam, une rivière qui délimite le sud du district de Bankim et qui est bordée par une plaine d'inondation et des marécages plus ou moins saisonniers. La fréquentation du barrage n'a pas été identifiée à un risque augmenté,

au contraire de la rivière Mbam. D'autres éléments semblent indiquer que la transmission de l'UB pourrait impliquer l'environnement domestique ou péri-domestique : le rôle protecteur des moustiquaires, la détection directe de MU et d'arthropodes positifs dans les points d'eau proches des villages [96,105].

L'étude des isochrones d'apparition du premier cas semble indiquer deux foyers principaux d'apparition de la maladie, au sud et à l'est du barrage. Les populations des villages de ces deux zones ont été affectées par la construction du barrage : modification des zones agricoles, déforestation… Elles pratiquent l'agriculture, soit à proximité du barrage, soit à proximité, voire au-delà, de la rivière Mbam.

Un scénario possible de l'émergence de l'UB conjugue la fréquentation de nouveaux environnements par les populations, en particulier des zones récemment défrichées, avec l'instauration d'un « relais » entre la plaine d'inondation du Mbam et le barrage de la Mappé qui assure la persistance de vastes zones marécageuses au fil des saisons. Dans la zone Sud où se concentrent les cas, les distances entre ces deux milieux sont compatibles avec les circulations d'insectes (en particulier Hémiptères aquatiques). Ces deux zones pourraient contribuer à maintenir les populations de MU ou de ses hôtes et favoriser la transmission, soit directement, soit dans les points d'eau péri-domestiques situés à proximité. L'absence de saisonnalité constatée dans l'incidence de l'UB serait ainsi expliquée par la persistance tout au long de l'année de conditions favorables, comme décrit en Ouganda (Figure 1.2, [72,76]). Ce scénario permet d'intégrer le long délai entre la construction du barrage et l'apparition des cas par une longue période au cours de laquelle les conditions sont devenues, peu à peu, favorables à MU et donc à l'émergence de cas d'UB.

### 4.2 La caractérisation de groupes à risque d'UB

La définition des groupes, zones et périodes à risque est importante pour l'élaboration d'hypothèses sur la chaîne de transmission et pour la mise en place de travaux de recherche visant à vérifier ces hypothèses : la connaissance de l'incidence de l'UB dans la zone d'Akonolinga a permis de localiser les sites de l'étude d'entomologie domestique dans deux zones contrastées mais présentant des incidences élevées, afin de maximiser les chances d'identifier des organismes positifs s'il y en avait.

Dans le futur, elle pourrait rendre possible la mise en place d'une cohorte prospective de suivi de l'incidence de l'UB : la seule façon de dimensionner cette cohorte à une taille acceptable serait d'en définir les critères d'inclusion de manière à cibler des individus appartenant à des groupes démographiques à haut risque, pour lesquels on s'attend à une incidence supérieure aux 2 à 4 cas/1000 personnes.années enregistrés en moyenne dans les zones à haut risque du district

d'Akonolinga. Un suivi fin pourrait également être modulé en distinguant entre des périodes à plus ou moins haut risque (définies par l'épidémiologie et la présence de MU dans l'environnement).

## 4.3 La prise en compte de l'environnement terrestre dans la transmission de *M. ulcerans* en Afrique

### *4.3.1 Un risque associé à l'environnement domestique*

L'étude cas-témoin réalisée en 2006 à Akonolinga avait mis en évidence pour la première fois une diminution du risque d'UB chez les personnes qui rapportaient l'utilisation d'une moustiquaire. D'autre part, cette étude avait également identifié des facteurs de risque associés à l'environnement immédiat des maisons, comme la présence de forêts et de cacaoyères [58]. A Bankim, nous avons retrouvé une association significative avec l'utilisation systématique d'une moustiquaire. L'analyse de la présence de MU dans les points d'eau de la région de Bankim, tout comme d'Akonolinga, a permis d'identifier MU dans des points d'eau proches des habitations [105,109,112]. D'autres groupes ont pu détecter MU dans les sédiments de points d'eau dont ils avaient documenté l'utilisation par les habitants des villages [96].

Les analyses spatiales démontrent que les cas d'UB se trouvent concentrés dans certaines zones, présentant des environnements particuliers, à Akonolinga (Chapitre 3) mais aussi au Bénin (Encadré 3.1) et à Bankim. La proximité entre le village et le fleuve Nyong est un facteur de risque important à Akonolinga, qui explique une part importante des variations spatiales d'incidences, et ce schéma est observé également au Bénin avec le fleuve Ouémé. Cette proximité est bien sûr à l'origine de contacts plus fréquents avec les environnements à risque, qui se traduisent par une augmentation du risque d'UB. Cependant, l'augmentation du risque pourrait résulter de la localisation de l'habitation *dans* l'environnement à risque. Cette interprétation est confortée par les résultats du travail de détection de MU dans la faune domestique et péri-domestique que nous avons effectué : non seulement nous avons détecté MU dans des spécimens appartenant à des familles très diverses d'insectes, ainsi que chez les araignées, mais en plus nous avons identifié une corrélation négative entre la proportion de pools positifs détectés dans une maison et la distance au fleuve Nyong dans les quatre villages situés le long du fleuve (Chapitre 4). De même, des analyses en cours montrent qu'il existe une association entre la concentration de MU dans un point d'eau et l'incidence d'UB au voisinage de ce point d'eau pour les zones où la présence de MU a été mesurée dans l'environnement aquatique [149].

### *4.3.2 Une circulation de* M. ulcerans *entre les différents milieux*

Pour la recherche de MU dans l'environnement domestique, nous avons travaillé dans des zones où l'incidence d'UB au cours des dernières années était élevée (Chapitre 3) et où MU avait précédemment été détecté dans l'environnement aquatique [105]. Ainsi, les maisons dans lesquelles nous avons travaillé sont à proximité immédiate des zones à risque (fleuve Nyong, marécage du « lac » d'Akonolinga) et l'on ne peut pas considérer ces environnements domestiques comme isolés des environnements voisins.

Nous avons identifié des insectes positifs parmi des taxons exophiles ayant des stades larvaires aquatiques. Mais nous avons aussi identifié des insectes positifs parmi des taxons comme les Gryllidés et les Blattidés, qui sont inféodés à l'intérieur des maisons. De même, d'autres familles, sans être endophiles, n'ont pas a priori de contacts avec les environnements aquatiques (Vespidés, Staphylinidés…). Il est envisageable que le passage de MU à ces taxons se fasse par la chaîne alimentaire avec la consommation de débris ou de proies porteurs de MU.

Il est difficile d'émettre des hypothèses de contamination pour tous les groupes identifiés positifs, mais on peut en déduire qu'il existe une circulation de MU au sein de l'environnement domestique et entre l'environnement aquatique et l'environnement domestique. Il est également probable que d'autres environnements « terrestres » abritent également des insectes positifs : les zones déforestées et cultivées en bordure des fleuves ou des marécages, qui sont des environnements associés à un risque élevé, sont des milieux à étudier en priorité. Les études de facteurs de risque réalisées au Cameroun et ailleurs, identifient fréquemment un risque accru chez les personnes qui ne portent pas des vêtements couvrant les membres lors des travaux des champs [58,59]. Des travaux qualitatifs approfondis sur la perception de l'origine de la maladie dans la région d'Akonolinga font ressortir le défrichage et la mise en culture des berges marécageuses du Nyong comme des pratiques agricoles qui auraient favorisé l'UB [140].

### *4.3.3 Le rôle de l'environnement terrestre reste à étudier dans les zones d'endémie africaines*

Notre travail permet enfin de disposer d'éléments de comparaison entre le foyer d'UB australien de Melbourne et les foyers d'UB d'Afrique de l'Ouest et du Cameroun, où ont eu lieu la majeure partie des travaux de recherche de MU à partir de l'environnement. En Australie, l'hypothèse de travail est que la transmission de MU implique les moustiques, les déjections des opossums et relativement peu l'environnement aquatique. En Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale, où les marsupiaux n'existent pas et où les vertébrés terrestres n'ont été étudiés que très marginalement, l'hypothèse de départ de la plupart des études est une transmission dans l'environnement aquatique.

En l'absence de données comparables, il était jusqu'à présent quasiment impossible d'émettre une hypothèse parcimonieuse pour la transmission de MU dans ces différents contextes. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ne permettent pas de démontrer, dans la zone endémique d'Afrique Centrale étudiée, l'existence d'une transmission de MU à l'humain dans l'environnement domestique, ou même terrestre. Cependant, notre démonstration de la présence d'insectes hématophages positifs pour MU dans l'environnement domestique souligne la nécessité de prendre en compte l'environnement terrestre dans de futures recherches. Certains auteurs suggèrent que plusieurs mécanismes de transmission pourraient cohabiter et se compléter pour expliquer l'incidence de l'UB. Il n'est plus possible d'exclure *a priori* un mécanisme de transmission dans l'environnement terrestre.

## 4.4 Vers un modèle actualisé de la transmission de MU

A l'issue de ce travail de thèse, complété par les données recueillies sur l'environnement aquatique des régions d'Akonolinga et de Bankim dans le cadre du projet EXTRA-MU, nous pouvons proposer une synthèse et un modèle actualisé de la dynamique et de la possible chaine de transmission de MU en zone endémique.

La présence de MU change de façon saisonnière dans l'environnement aquatique, avec une expansion forte au moment de la saison des pluies et des inondations (Figure 5.1). Dans l'environnement domestique, nous avons identifié la présence de MU durant la saison sèche, les données de saison pluvieuse ne sont pas encore disponibles.

Il est nécessaire de tenir compte de trois circulations de MU : dans l'environnement aquatique, dans l'environnement domestique (terrestre si l'on prend en compte les résultats d'Australie entre opossums et moustique), et entre ces deux environnements (Figure 5.1). La circulation implique probablement les chaines alimentaires au sein des deux milieux, et de l'environnement aquatique vers l'environnement domestique, la dispersion d'insectes aériens au stade adulte et aquatique au stade larvaire, et peut-être un transport par les habitants depuis les environnements aquatiques jusqu'à leur maison. Sur la base des observations réalisées en Australie sur les opossums, et sur la capacité de MU à infecter divers mammifères, on ne peut pas exclure l'existence d'autres hôtes parmi les Vertébrés terrestres, bien qu'aucun n'ait encore été décrit dans les zones endémiques africaines.

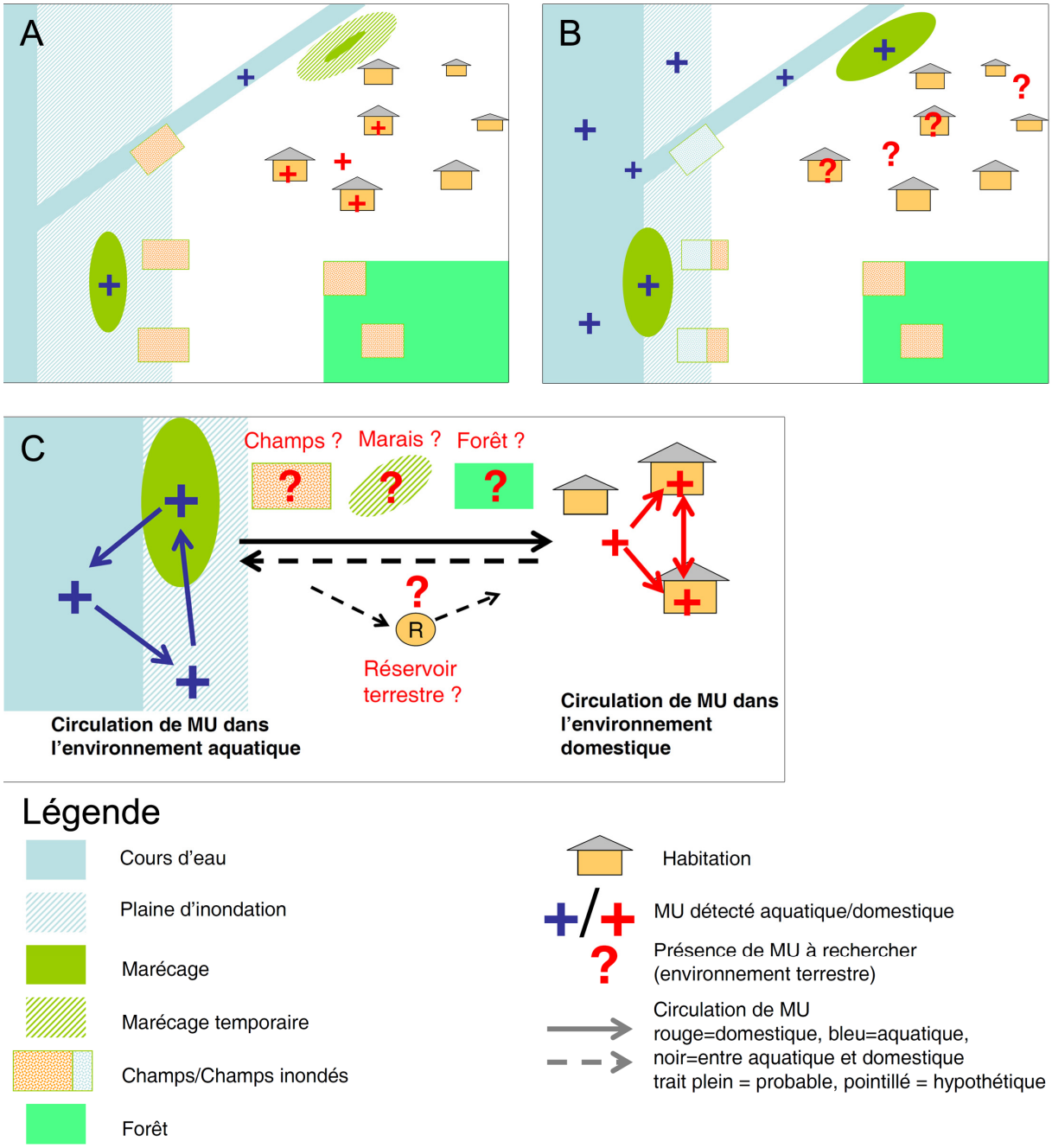



**Figure 5.1 : Schéma de synthèse de la présence de *M. ulcerans* dans l'environnement des régions endémiques africaines.** A: résultats de détection de MU en saison sèche; B : résultats de détection de MU en saison des pluies; C : modèle de circulation de MU, mettant en évidence la nécessité de recueillir des données sur l'environnement terrestre.

Une tentative de modèle doit rendre compte de variations spatiales et temporelles du risque d'UB et de la présence de MU selon les différents environnements (Figure 5.2). Le fleuve Nyong intervient par sa proximité (gradient de risque décroissant avec distance) et son niveau d'eau (période d'inondation à haut risque de transmission). Les paysages les plus à risque présentent une superficie importante de marécages, cultivés ou pas, et une forêt dégradée. Ces résultats épidémiologiques sont corroborés par la détection de MU dans certains environnements. Il est plus difficile d'inclure les effets des comportements des populations, mais il faut garder à l'esprit leur importance, car plus de 50 % des variations observées de l'incidence dans les villages ne sont pas expliqués par des facteurs environnementaux (Chapitre 3). Des modifications dans les pratiques ou des changements saisonniers pourraient expliquer certaines variations de l'exposition, ou favoriser par endroits l'augmentation de MU dans l'environnement, comme par exemple dans les zones de marécages cultivés ou de forêt dégradée. La susceptibilité génétique pourrait également jouer un rôle.

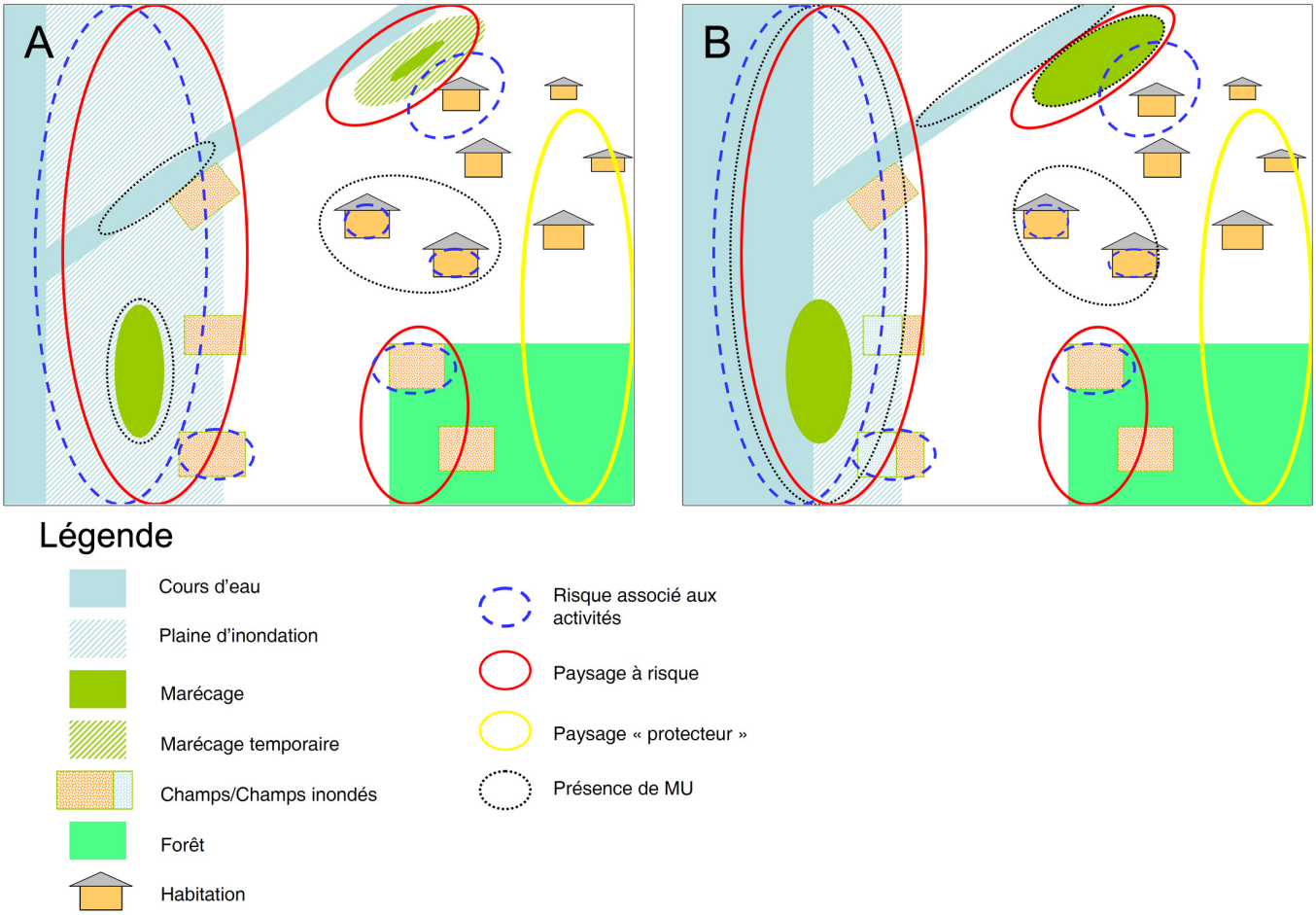



**Figure 5.2 : Synthèse des environnements à risque d'ulcère de Buruli selon le type de risque, lié aux activités ou à l'environnement, et la présence de MU.** A: Saison sèche; B: Saison pluvieuse (saison à risque). Les risques identifiés ne sont pas caractérisés dans le temps, mais on peut déduire leurs variations en fonction de la présence ou absence de MU dans les environnements concernés.

Le modèle qui se dessine est celui de zones de risque permanent, les marécages, avec une expansion saisonnière du risque. Le risque augmenterait d'abord au niveau des grands cours d'eau en début de saison des pluies, puis dans les zones inondables, en particulier déforestées et cultivées, puis dans les ruisseaux affluents, au fur et à mesure de l'augmentation de la présence de MU dans ces environnements (augmentation du nombre de sites positifs et de la concentration de MU). Il sera crucial de vérifier si la présence de MU dans les arthropodes domestiques subit des variations saisonnières. Les occasions de contacts entre les populations et MU ne devraient pas être rares, au vu de la fréquence avec laquelle on détecte des éléments positifs dans l'environnement. On peut donc supposer que la combinaison de circonstances qui permet l'infection doit, elle, se produire rarement.

En termes de mécanisme, ces travaux ne pas permettent pas de mettre en évidence un mécanisme préférentiel. Ils montrent que, tout comme en Australie, des arthropodes non aquatiques sont positifs, parmi lesquels plusieurs groupes d'insectes hématophages. Ils soulignent la probable existence d'une circulation de MU hors de l'environnement aquatique. Tous ces arguments empêchent de rejeter l'hypothèse d'un vecteur non-aquatique, ce d'autant que des travaux de modélisation en cours semblent indiquer que les variations de niveau global de MU dans l'environnement aquatique expliqueraient mieux l'incidence de l'UB au voisinage des points d'eau étudiés que la présence spécifique de MU dans les Hémiptères aquatiques [149].

## 5. Perspectives de recherches et verrous méthodologiques

Les hypothèses qui ont été émises sur la chaîne de transmission et les facteurs associés à la maladie doivent testées, mais certains outils, qui n'existent pas encore, sont indispensables pour permettre à la recherche de progresser : les études cas témoins sur l'UB montrent bien les limites de la répétition d'un outil imparfait, et le faible niveau de découvertes que l'on peut en attendre après un certain nombre de répétitions. Le tableau ci-dessous récapitule les principales hypothèses, les blocages et les outils nécessaires à lever les blocages constatés (Tableau 5.3).

**Tableau 5.3 : Hypothèses à tester, verrous, et outils nécessaires**

| Hypothèse à tester | Verrou | Outil nécessaire |
|---|---|---|
| Evaluation prospective des facteurs de risque individuels (soins des plaies, utilisation d'une moustiquaire, fréquentation d'environnements particuliers, saisonnalité) | Faible nombre de cas<br>Impossible de différencier les individus susceptibles des individus infectés asymptomatiques ou immunisés | Marqueur d'exposition à MU |
| Lien entre l'infection par MU et le VIH | Faible nombre de co-infections | Collaboration d'équipes de plusieurs sites dans le cadre de travaux multicentriques |
| Rôle de phénomènes climatiques de basse fréquence (El Niño) dans les variations temporelles à moyen terme | Faible nombre de cas, faible longueur des séries temporelles | Collaboration d'équipes de plusieurs sites dans le cadre de travaux multicentriques |
| Existence d'un insecte ou arthropode vecteur | Pas de données sur les souches de MU détectées dans l'environnement | Génotypage des isolats patients, description de SNP et génotypage des échantillons environnementaux |
| | Pas d'éléments sur la localisation et la viabilité de MU dans les Arthropodes capturés sur le terrain | Méthodes de sélection de spécimens positifs et outils d'analyse (microscopie ? culture) |
| Existence d'un insecte ou arthropode vecteur aérien ou terrestre | Pas de démonstration de la plausibilité biologique | Modèle expérimental de transmission non aquatique |
| Rôle de l'environnement terrestre près des marécages ?<br>Rôle des végétaux ? | Effort d'échantillonnage et de tri<br>Coûts d'analyse | Développer des stratégies d'échantillonnage et d'analyse ciblées |

# Conclusion

Ce travail propose quelques bases sur lesquelles construire une stratégie de santé publique vis-à-vis de l'ulcère de Buruli, ainsi que pour approfondir les recherches sur le mode de transmission de MU. Ces résultats ont été obtenus par la combinaison d'approches épidémiologiques quantitatives à l'échelle individuelle et populationnelle, nourries par un dialogue soutenu avec l'approche anthropologique et l'entomologie de terrain.

L'identification de paramètres environnementaux, individuels, saisonniers et climatiques devrait permettre de mieux coordonner les activités de santé publique et de recherche, dans l'espace et dans le temps, tout en ciblant particulièrement les groupes démographiques à risque.

L'UB apparaît comme une maladie étroitement liée aux conditions environnementales à l'échelle locale (paysage, inondation), qui nécessite des approches d'agrégation des données à la bonne granularité spatiale ou temporelle afin de pouvoir identifier des tendances pertinentes pour la définition du risque. La maladie n'est pourtant pas entièrement déterminée par l'environnement naturel : une grande part des variations d'incidence dépend aussi des comportements des populations, comme l'illustrent les différences de taux d'incidence entre hommes et femmes entre les foyers. Ainsi, des actions visant à mieux prévenir l'infection au niveau des populations pourraient avoir un effet important.

L'un des points forts de ce travail est d'avoir été réalisé au Cameroun, sur le continent africain dont sont originaires 95 % des cas, et d'avoir pu disposer de données provenant plusieurs sites pour vérifier si les résultats obtenus pouvaient être répliqués. Nous avons aussi pu généraliser l'observation d'Arthropodes terrestres positifs pour MU, précédemment restreinte au foyer atypique australien de Melbourne.

L'intégration de ces travaux au sein du projet EXTRA-MU démontre une fois encore la richesse de l'approche de santé publique. Ce travail s'est nourri et a permis de nourrir des questionnements dans des disciplines aussi diverses ici que l'anthropologie de la santé, l'écologie, et la modélisation des maladies infectieuses, l'entomologie, la génétique et la génomique des populations humaines et microbiennes. La tâche passionnante de l'épidémiologiste est d'intégrer les résultats de ces différentes approches afin de les appliquer sur le terrain, pour améliorer la santé des individus et des populations.

# Bibliographie


1. Wansbrough-Jones M, Phillips R. Buruli ulcer: emerging from obscurity. Lancet **2006**; 367:1849–58.

2. Portaels F, Silva MT, Meyers WM. Buruli ulcer. Clinics in dermatology **2009**; 27:291–305.

3. Johnson PDR, Stinear T, Small PLC, et al. Buruli ulcer (M. ulcerans infection): new insights, new hope for disease control. PLoS medicine **2005**; 2:e108.

4. Merritt RW, Walker ED, Small PLC, et al. Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. PLoS neglected tropical diseases **2010**; 4:e911.

5. Uganda Buruli Group. Epidemiology of Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **1971**; 65:763–75.

6. Schütte D, Pluschke G. Immunosuppression and treatment-associated infl ammatory response in patients with Mycobacterium ulcerans infection ( Buruli ulcer ). **2009**; :187–200.

7. Silva MT, Portaels F, Pedrosa J. Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite Mycobacterium ulcerans leading to Buruli ulcer. The Lancet infectious diseases **2009**; 9:699–710.

8. Stienstra Y, Van der Werf TS, Oosterom E, et al. Susceptibility to Buruli ulcer is associated with the SLC11A1 (NRAMP1) D543N polymorphism. Genes and immunity **2006**; 7:185–9.

9. Vincent QB. Epidémiologie et génétique humaine de l'infection par Mycobacterium ulcerans. 2011;

10. Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. Human genetics **2008**; 123:227–35.

11. Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova J-L. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. The Journal of experimental medicine **2005**; 202:1617–21.

12. Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh CR, et al. Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire. The American journal of tropical medicine and hygiene **1995**; 52:219–24.

13. Dobos KM, Spotts E a, Marston BJ, Horsburgh CR, King CH. Serologic response to culture filtrate antigens of Mycobacterium ulcerans during Buruli ulcer disease. Emerging infectious diseases **2000**; 6:158–64.

14. Pidot SJ, Porter JL, Marsollier L, et al. Serological evaluation of Mycobacterium ulcerans antigens identified by comparative genomics. PLoS neglected tropical diseases **2010**; 4:e872.

15. Yeboah-Manu D, Röltgen K, Opare W, et al. Sero-epidemiology as a tool to screen populations for exposure to Mycobacterium ulcerans. PLoS neglected tropical diseases **2012**; 6:e1460.

16. Trubiano JA, Lavender CJ, Fyfe JAM, Bittmann S, Johnson PDR. The incubation period of Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection). PLoS neglected tropical diseases **2013**; 7:e2463.

17. Marion E, Song O-R, Christophe T, et al. Mycobacterial Toxin Induces Analgesia in Buruli Ulcer by Targeting the Angiotensin Pathways. Cell **2014**; 157:1565–1576.

18. Gordon CL, Buntine J a, Hayman J a, et al. Spontaneous clearance of Mycobacterium ulcerans in a case of Buruli ulcer. PLoS neglected tropical diseases **2011**; 5:e1290.

19. World Health Organization. Laboratory diagnosis of Buruli ulcer: a manual for health-care providers. World Heal. Geneva: 2014.

20. World Health Organization. Treatment of mycobacterium ulcerans disease (buruli ulcer): guidance for health workers. 2012;

21. Lehman L, Simonet V, Saunderson P, Agbenorku P. Buruli ulcer: Prevention of disabilities. 2006.

22. Vincent QB, Ardant M-F, Adeye A, et al. Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study. The Lancet Global Health **2014**; 2:e422–e430.

23. Pommelet V, Vincent QB, Ardant M-F, et al. Findings in Patients From Benin With Osteomyelitis and Polymerase Chain Reaction-Confirmed Mycobacterium ulcerans Infection. Clinical infectious diseases **2014**; in press:1–9.

24. World Health Organization. Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection). Factsheet n° 199 **2013**;

25. Huang GKL, Johnson PDR. Epidemiology and management of Buruli ulcer. Expert review of anti-infective therapy **2014**; 12:855–865.

26. Etuaful S, Carbonnelle B, Grosset J, et al. Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of Mycobacterium ulcerans in early lesions of Buruli ulcer in Humans. Antimicrobial agents and chemotherapy **2005**; 49:3182–3186.

27. Chauty A, Ardant M-F, Adeye A, et al. Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans disease). Antimicrobial agents and chemotherapy **2007**; 51:4029–35.

28. Chauty A, Ardant M-F, Marsollier L, et al. Oral treatment for Mycobacterium ulcerans infection: results from a pilot study in Benin. Clinical Infectious Diseases **2011**; 52:94–96.

29. Teelken M a., Stienstra Y, Ellen DE, et al. Buruli ulcer: differences in treatment outcome between two centres in Ghana. Acta Tropica **2003**; 88:51–56.

30. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Portaels F. Buruli ulcer recurrence, Benin. Emerging infectious diseases **2005**; 11:584–9.

31. Nienhuis W a, Stienstra Y, Thompson W a, et al. Antimicrobial treatment for early, limited Mycobacterium ulcerans infection: a randomised controlled trial. Lancet **2010**; 375:664–72.

32. Smith PG, Revill WD, Lukwago E, Rykushin YP. The protective effect of BCG against Mycobacterium ulcerans disease: a controlled trial in an endemic area of Uganda. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **1976**; 70:449–57.

33. Nackers F, Dramaix M, Johnson RC, et al. BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer: a case-control study in Benin. The American journal of tropical medicine and hygiene **2006**; 75:768–74.

34. Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Gue A, Meyers WM. Mycobacterium bovis BCG Vaccination as Prophylaxis against Mycobacterium ulcerans Osteomyelitis in Buruli Ulcer Disease. **2004**; 72:62–65.

35. World Health Organisation - Global Buruli Ulcer Initiative Meeting. Buruli ulcer control and research: Summary Data. 2012. Available at: http://www.who.int/buruli/Summary_data_and_new_target_2013.pdf. Accessed 12 December 2013.

36. Ravisse P, Roques M-C, Le Bourthe F, Tchuembou C, Ménard J-C. Une affection méconnue au Cameroun, l'ulcère à mycobactérie. 1975; :471–475.

37. Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, et al. Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. Emerging infectious diseases **2002**; 8:167–70.

38. Oluwasanmi JO, Solanke TF, Olurin EO, Itayemi SO, Alabi GO, Lucas AO. Mycobacterium ulcerans (Buruli) skin ulceration in Nigeria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **1976**; 25:122–128.

39. Kibadi K, Panda M, Tamfum J-JM, et al. New foci of Buruli ulcer, Angola and Democratic Republic of Congo. Emerging infectious diseases **2008**; 14:1790–2.

40. Um Boock A, Wiss K, Eyangoh S. [Preliminary national survey on Buruli ulcer in Cameroon]. Bulletin de l'ALLF **2005**; :41–42.

41. World Health Organization. Buruli ulcer: Mycobacterium ulcerans infection. 2000.

42. Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portaels F. Mycobacterium ulcerans infection: control, diagnosis, and treatment. The Lancet infectious diseases **2006**; 6:288–96.

43. Morris A, Gozlan R, Marion E, et al. First detection of Mycobacterium ulcerans DNA in environmental samples from South America. PLoS Neglected Tropical Diseases **2014**; 8:e2660.

44. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. 2014.

45. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2010.

46. Phanzu DM, Suykerbuyk P, Saunderson P, et al. Burden of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) and the underreporting ratio in the territory of Songololo, Democratic Republic of Congo. PLoS neglected tropical diseases **2013**; 7:e2563.

47. Porten K, Sailor K, Comte E, et al. Prevalence of Buruli ulcer in Akonolinga health district, Cameroon: results of a cross sectional survey. PLoS neglected tropical diseases **2009**; 3:e466.

48. Barogui YT, Sopoh GE, Johnson RC, et al. Contribution of the community health volunteers in the control of buruli ulcer in bénin. PLoS neglected tropical diseases **2014**; 8:e3200.

49. Kibadi K, Aujoulat I, Meyers WM, Mokassa L, Muyembe T, Portaels F. [Study of names and folklore associated with Mycobacterium ulcerans infection in various endemic countries in Africa]. Médecine tropicale : revue du Corps de santé colonial **2007**; 67:241–8.

50. Aujoulat I, Johnson C, Zinsou C, Guédénon A, Portaels F. Psychosocial aspects of health seeking behaviours of patients with Buruli ulcer in southern Benin. Tropical medicine & international health : TM & IH **2003**; 8:750–9.

51. Peeters Grietens K, Toomer E, Um Boock A, et al. What role do traditional beliefs play in treatment seeking and delay for Buruli ulcer disease?--insights from a mixed methods study in Cameroon. PloS one **2012**; 7:e36954.

52. Mulder A a, Boerma RP, Barogui Y, et al. Healthcare seeking behaviour for Buruli ulcer in Benin: a model to capture therapy choice of patients and healthy community members. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **2008**; 102:912–20.

53. Grietens KP, Boock AU, Peeters H, Hausmann-Muela S, Toomer E, Ribera JM. "It is me who endures but my family that suffers": social isolation as a consequence of the household cost burden of Buruli ulcer free of charge hospital treatment. PLoS neglected tropical diseases **2008**; 2:e321.

54. Barogui Y, Johnson RC, Van der Werf TS, et al. Functional limitations after surgical or antibiotic treatment for Buruli ulcer in Benin. The American journal of tropical medicine and hygiene **2009**; 81:82–7.

55. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez M-G, et al. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. PLoS neglected tropical diseases **2014**; 8:e2865.

56. Hill AB. The environment and disease : association or causation ? Proceedings of the Royal Society of Medicine **1965**; 58:295–300.

57. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, et al. Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity. Tropical medicine & international health : TM & IH **2004**; 9:1297–304.

58. Pouillot R, Matias G, Wondje CM, et al. Risk factors for buruli ulcer: a case control study in Cameroon. PLoS neglected tropical diseases **2007**; 1:e101.

59. Raghunathan PL, Whitney E a S, Asamoa K, et al. Risk factors for Buruli ulcer disease (Mycobacterium ulcerans Infection): results from a case-control study in Ghana. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **2005**; 40:1445–53.

60. Nackers F, Johnson RC, Glynn JR, Zinsou C, Tonglet R, Portaels F. Environmental and health-related risk factors for Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) in Benin. The American journal of tropical medicine and hygiene **2007**; 77:834–6.

61. Jacobsen KH, Padgett JJ. Risk factors for Mycobacterium ulcerans infection. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases **2010**; 14:e677–81.

62. Debacker M, Portaels F, Aguiar J, et al. Risk factors for Buruli ulcer, Benin. Emerging infectious diseases **2006**; 12:1325–31.

63. Johnson RC, Nackers F, Glynn JR, et al. Association of HIV infection and Mycobacterium ulcerans disease in Benin. AIDS **2008**; 22:901–903.

64. Institut National de la Statistique (INS) et ICF. International. Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples du Cameroun 2011. Calverton, Maryland, USA: 2012.

65. Vincent QB, Ardant M-F, Marsollier L, Chauty A, Alcaïs A. HIV infection and Buruli ulcer in Africa. The Lancet infectious diseases **2014**; 14:796–7.

66. Christinet V. Influence du statut immunologique sur l'évolution de l'ulcère de Buruli chez les patients co-infectés par le VIH et sur le traitement (abstract). In: Global Buruli ulcer initiative conference (WHO). 2011.

67. BCG vaccination against mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer). First results of a trial in Uganda. Lancet **1969**; 1:111–5.

68. Sopoh GE, Barogui YT, Johnson RC, et al. Family relationship, water contact and occurrence of Buruli ulcer in Benin. PLoS neglected tropical diseases **2010**; 4:e746.

69. Aiga H, Amano T, Cairncross S, et al. Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. The American journal of tropical medicine and hygiene **2004**; 71:387–92.

70. Quek TYJ, Athan E, Henry MJ, et al. Risk factors for Mycobacterium ulcerans infection, southeastern Australia. Emerging infectious diseases **2007**; 13:1661–6.

71. Bratschi MW, Bolz M, Minyem JC, et al. Geographic distribution, age pattern and sites of lesions in a cohort of Buruli ulcer patients from the Mapé Basin of Cameroon. PLoS neglected tropical diseases **2013**; 7:e2252.

72. Barker DJP, Carswell JW. Mycobacterium ulcerans infection among tse-tse control workers in Uganda. International journal of epidemiology **1970**; 2:161–166.

73. Lunn HF, Connor DH, Wilks NE, et al. Buruli (mycobacterial) ulceration in Uganda (a new focus of Buruli ulcer in Madi district, Uganda): report of a field study. East African medical journal **1965**; 42:275–88.

74. Barker DJ. Buruli disease in a district of Uganda. The Journal of tropical medicine and hygiene **1971**; 74:260–4.

75. Barker DJ. The distribution of Buruli disease in Uganda. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **1972**; 66:867–74.

76. Revill WLD, Barker DJP. Seasonal distribution of mycobacterial skin ulcers. Brit. J. prev. soc. Med. **1972**; 26:23–27.

77. Johnson RC, Sopoh GE, Barogui Y, Dossou A, Fourn L, Zohoun T. Mise en place d'un système de surveillance de l'ulcère de Buruli au Bénin: point de 4 années de surveillance. Cahiers Santé **2008**; 18:9–13.

78. Brou T, Broutin H, Elguero E, Asse H, Guegan J-F. Landscape diversity related to Buruli ulcer disease in Côte d'Ivoire. PLoS neglected tropical diseases **2008**; 2:e271.

79. Noeske J, Kuaban C, Rondini S, et al. Buruli ulcer disease in Cameroon rediscovered. The American journal of tropical medicine and hygiene **2004**; 70:520–6.

80. Wagner T, Benbow ME, Brenden TO, Qi J, Johnson RC. Buruli ulcer disease prevalence in Benin, West Africa: associations with land use/cover and the identification of disease clusters. International journal of health geographics **2008**; 7:25.

81. Van Ravensway J, Benbow ME, Tsonis AA, et al. Climate and landscape factors associated with Buruli ulcer incidence in Victoria, Australia. PloS one **2012**; 7:e51074.

82. Sopoh GE, Johnson RC, Anagonou SY, et al. Buruli ulcer prevalence and altitude, Benin. Emerging infectious diseases **2011**; 17:153–4.

83. Duker A a, Carranza EJ, Hale M. Spatial dependency of Buruli ulcer prevalence on arsenic-enriched domains in Amansie West District, Ghana: implications for arsenic mediation in Mycobacterium ulcerans infection. International journal of health geographics **2004**; 3:19.

84. Wagner T, Benbow ME, Burns M, et al. A Landscape-based model for predicting Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer disease) presence in Benin, West Africa. EcoHealth **2008**; 5:69–79.

85. Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, et al. Distribution of Mycobacterium ulcerans in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. PLoS neglected tropical diseases **2008**; 2:e205.

86. Williamson HR, Benbow ME, Campbell LP, et al. Detection of Mycobacterium ulcerans in the environment predicts prevalence of Buruli ulcer in Benin. PLoS neglected tropical diseases **2012**; 6:e1506.

87. Röltgen K, Qi W, Ruf M-T, et al. Single nucleotide polymorphism typing of Mycobacterium ulcerans reveals focal transmission of buruli ulcer in a highly endemic region of Ghana. PLoS neglected tropical diseases **2010**; 4:e751.

88. Morris A, Gozlan RE, Hassani H, Andreou D, Couppié P, Guégan J-F. Complex temporal climate signals drive the emergence of human water-borne disease. Emerging Microbes and Infections **2014**; in press.

89. Cazelles B, Chavez M, Magny GC De, Guégan J-F, Hales S. Time-dependent spectral analysis of epidemiological time-series with wavelets. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society **2007**; 4:625–36.

90. Rosenblueth M, Martinez-Romero JC, Reyes-Prieto M, Rogel M a, Martinez-Romero E. Environmental mycobacteria: a threat to human health? DNA and cell biology **2011**; 30:633–40.

91. Barker DJP, Clancey JK, Morrow RH, Rao S. Transmission of Buruli disease. British medical journal **1970**; :558–559.

92. Marsollier L, Robert R, Aubry J, et al. Aquatic insects as a vector for Mycobacterium ulcerans. Applied and environmental microbiology **2002**; 68:4623–4628.

93. Portaels F, Meyers WM, Ablordey A, et al. First cultivation and characterization of Mycobacterium ulcerans from the environment. PLoS neglected tropical diseases **2008**; 2:e178.

94. Marsollier L, Stinear T, Aubry J, et al. Aquatic Plants Stimulate the Growth of and Biofilm Formation by Mycobacterium ulcerans in Axenic Culture and Harbor These Bacteria in the Environment. **2004**; 70:1097–1103.

95. Marsollier L, Tchibozo S, Aubry J, et al. Aquatic Snails , Passive Hosts of Mycobacterium ulcerans. **2004**; 70:6296–6298.

96. Bratschi MW, Ruf M-T, Andreoli A, et al. Mycobacterium ulcerans persistence at a village water source of Buruli ulcer patients. PLoS neglected tropical diseases **2014**; 8:e2756.

97. Stinear T, Ross BC, Davies JK, et al. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of Mycobacterium ulcerans by PCR. Journal of clinical microbiology **1999**; 37:1018–23.

98. Fyfe JAM, Lavender CJ, Johnson PDR, et al. Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of Mycobacterium ulcerans in clinical and environmental samples. Applied and environmental microbiology **2007**; 73:4733–40.

99. Roberts B, Hirst R. Immunomagnetic separation and PCR for detection of Mycobacterium ulcerans . Immunomagnetic Separation and PCR for Detection of Mycobacterium ulcerans. **1997**; 35.

100. Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, et al. Detection of Mycobacterium ulcerans in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. Applied and environmental microbiology **1997**; 63:4135–8.

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

102. Vandelannoote K, Durnez L, Amissah D, et al. Application of real-time PCR in Ghana, a Buruli ulcer-endemic country, confirms the presence of Mycobacterium ulcerans in the environment. FEMS microbiology letters **2010**; 304:191–4.

103. Fyfe JAM, Lavender CJ, Handasyde KA, et al. A major role for mammals in the ecology of Mycobacterium ulcerans. PLoS neglected tropical diseases **2010**; 4:e791.

104. McIntosh M, Williamson H, Benbow ME, et al. Associations Between Mycobacterium ulcerans and Aquatic Plant Communities of West Africa: Implications for Buruli Ulcer Disease. EcoHealth **2014**;

105. Garchitorena A, Roche B, Kamgang R, et al. Mycobacterium ulcerans ecological dynamics and its association with freshwater ecosystems and aquatic communities: results from a 12-month environmental survey in Cameroon. PLoS Neglected Tropical Diseases **2014**; 8:e2879.

106. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres a, Fonteyne P a, Meyers WM. Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection. Lancet **1999**; 353:986.

107. Benbow ME, Williamson H, Kimbirauskas R, et al. Aquatic invertebrates as unlikely vectors of Buruli ulcer disease. Emerging infectious diseases **2008**; 14:1247–54.

108. Willson SJ, Kaufman MG, Merritt RW, Williamson HR, Malakauskas DM, Benbow ME. Fish and amphibians as potential reservoirs of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer disease. Infection Ecology and Epidemiology **2013**; 1:1–13.

109. Marion E, Landier J, Boisier P, et al. Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon. Emerging Infectious Diseases **2011**; :2–6.

110. Marion E, Deshayes C, Chauty A, et al. Détection des signatures moléculaires de Mycobacterium ulcerans chez des punaises aquatiques capturées au Bénin en dehors de leur environnement aquatique. **2011**; :5–8.

111. Doannio J, Konan K, Dosso F, et al. Micronecta sp (Corixidae) et Diplonychus sp (Belostomatidae), deux hémiptères aquatiques hôtes et/ou vecteurs potentiels de Mycobacterium ulcerans agent pathogène de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Medecine Tropicale **2011**; :53–57.

112. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, et al. Seasonal and regional dynamics of M. ulcerans transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors. PLoS neglected tropical diseases **2010**; 4:e731.

113. Kotlowski R. One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of Mycobacterium ulcerans in aquatic insects, molluscs and fish. Journal of Medical Microbiology **2004**; 53:927–933.

114. Durnez L, Suykerbuyk P, Nicolas V, et al. Terrestrial small mammals as reservoirs of Mycobacterium ulcerans in benin. Applied and environmental microbiology **2010**; 76:4574–7.

115. Johnson PDR, Azuolas J, Lavender CJ, et al. Mycobacterium ulcerans in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. Emerging infectious diseases **2007**; 13:1653–60.

116. Lavender CJ, Fyfe JAM, Azuolas J, et al. Risk of Buruli ulcer and detection of Mycobacterium ulcerans in mosquitoes in southeastern Australia. PLoS neglected tropical diseases **2011**; 5:e1305.

117. Carson C, Lavender CJ, Handasyde KA, et al. Potential wildlife sentinels for monitoring the endemic spread of human buruli ulcer in South-East australia. PLoS neglected tropical diseases **2014**; 8:e2668.

118. Carson C, Lavender CJ, Handasyde KA, et al. Potential Wildlife Sentinels for Monitoring the Endemic Spread of Human Buruli Ulcer in South-East Australia. **2014**; 8:4–9.

119. Mosi L, Williamson H, Wallace JR, Merritt RW, Small PLC. Persistent association of Mycobacterium ulcerans with West African predaceous insects of the family belostomatidae. Applied and environmental microbiology **2008**; 74:7036–42.

120. Wallace JR, Gordon MC, Hartsell L, et al. Interaction of Mycobacterium ulcerans with mosquito species: implications for transmission and trophic relationships. Applied and environmental microbiology **2010**; 76:6215–22.

121. Marsollier L, André J-PS, Frigui W, et al. Early trafficking events of Mycobacterium ulcerans within Naucoris cimicoides. Cellular microbiology **2007**; 9:347–55.

122. Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, et al. Protection against Mycobacterium ulcerans lesion development by exposure to aquatic insect saliva. PLoS medicine **2007**; 4:e64.

123. Williamson HR, Mosi L, Donnell R, Aqqad M, Merritt RW, Small PLC. Mycobacterium ulcerans fails to infect through skin abrasions in a guinea pig infection model: implications for transmission. PLoS neglected tropical diseases **2014**; 8:e2770.

124. Fowler J, Mahlen SD. Localized cutaneous infections in immunocompetent individuals due to rapidly growing mycobacteria. Archives of pathology & laboratory medicine **2014**; 138:1106–9.

125. Deshayes C, Angala SK, Marion E, et al. Regulation of mycolactone, the Mycobacterium ulcerans toxin, depends on nutrient source. PLoS neglected tropical diseases **2013**; 7:e2502.

126. Veitch MG, Johnson PD, Flood PE, Leslie DE, Street a C, Hayman J a. A large localized outbreak of Mycobacterium ulcerans infection on a temperate southern Australian island. Epidemiology and infection **1997**; 119:313–8.

127. Röltgen K, Stinear TP, Pluschke G. The genome, evolution and diversity of Mycobacterium ulcerans. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases **2012**; 12:522–9.

128. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer. Genome research **2007**; 17:192–200.

129. Ravisse P. [Skin ulcer caused by Mycobacterium ulcerans in Cameroon. I. Clinical, epidemiological and histological study]. Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales **1977**; 70:109–24.

130. Landier J, Gaudart J, Carolan K, et al. Spatio-temporal dynamics and landscape-associated risk of Buruli ulcer in Akonolinga, Cameroon. PLoS Negl Trop Dis **2014**; 8:e3123.

131. Kanga JM, Kacou ED. [Epidemiological aspects of Buruli ulcer in Côte d'Ivoire: results of a national survey]. Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990) **2001**; 94:46–51.

132. Darie H, Le Guyadec T, Touze JE. [Epidemiological and clinical aspects of Buruli ulcer in Côte d'Ivoire - à propos 124 recent observations]. Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990) **1993**; 86:272–276.

133. Monitoring Agriculture with Remote Sensing. 2013. Available at: http://www.marsop.info/. Accessed 14 September 2013.

134. ORE BVET. BVET, Cameroon, Hydrological data. 2012;

135. Constantin de Magny G, Guégan J-F, Petit M, Cazelles B. Regional-scale climate-variability synchrony of cholera epidemics in West Africa. BMC infectious diseases **2007**; 7:20.

136. Agier L, Deroubaix A, Martiny N, Yaka P, Djibo A, Broutin H. Seasonality of meningitis in Africa and climate forcing: aerosols stand out. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society **2013**; 10:20120814.

137. Hashizume M, Chaves LF, Minakawa N. Indian Ocean Dipole drives malaria resurgence in East African highlands. Scientific reports **2012**; 2:269.

138. Ravisse P, Roques M-C, Le Bourthe F, Tchuembou C, Menard JC. [An unknown disease in Cameroon: mycobacterial ulcer]. Medecine Tropicale **1975**; 35:471–474.

139. Le Gall P, Le Club CJRD-CIAH, Kamgang R. [Cetonidae from the Mbam-Minkom, a site threatened by urban development in the region of Yaoundé, Cameroon]. Le Coléoptériste **2011**; 14:171–180.

140. Giles-Vernick T, Owona-Ntsama J, Landier J, Eyangoh S. The puzzle of Buruli ulcer transmission, ethno-ecological history and the end of "love" in the Akonolinga district, Cameroon. Social science & medicine **2014**;

141. Landier J, Boisier P, Fotso Piam F, et al. Adequate Wound Care and Use of Bed Nets as Protective Factors against Buruli Ulcer: Results from a Case Control Study in Cameroon. PLoS Negl Trop Dis **2011**; 5:e1392.

142. Scholtz CH, Holm E. Insects of Southern Africa. Durban: Butterworths, 1985.

143. Delvare G, Aberlenc H-P. Les insectes d'Afrique et d'Amérique tropicale. Clés pour la reconnaissance des familles. PRIFAS. Montpellier: 1989: 302p.

144. Rondini S, Troll H, Bodmer T, Pluschke G. Development and Application of Real-Time PCR Assay for Quantification of Mycobacterium ulcerans DNA. Journal of clinical microbiology **2003**; 41:4231–4237.

145. Simard F, Nchoutpouen E, Toto JC, Fontenille D. Geographic Distribution and Breeding Site Preference of Aedes albopictus and Aedes aegypti ( Diptera : Culicidae ) in Cameroon , Central Africa. Journal of Medical Entomology **2005**; 42:726–731.

146. Mougin B, Avenel-Audran M, Hasseine L, et al. A cutaneous ulcer resulting from Mycobacterium ulcerans--Leishmania braziliensis coinfection in South America. The American journal of tropical medicine and hygiene **2011**; 85:897–9.

147. Moonesinghe R, Khoury MJ, Janssens a CJW. Most published research findings are false-but a little replication goes a long way. PLoS medicine **2007**; 4:e28.

148. Haute Autorité de Santé. Niveau de preuve et gradation des recommandations de bonne pratique. 2013.

149. Garchitorena A, Ngonghala CN, Landier J, et al. Modelling the transmission of M. ulcerans from the environment to humans. **2014**; in prep.

150. Diaz D, Döbeli H, Yeboah-Manu D, et al. Use of the immunodominant 18-kiloDalton small heat shock protein as a serological marker for exposure to Mycobacterium ulcerans. Clinical and vaccine immunology : CVI **2006**; 13:1314–21.

151. Pommelet V, Vincent QB, Ardant M-F, et al. Findings in Patients From Benin With Osteomyelitis and Polymerase Chain Reaction-Confirmed Mycobacterium ulcerans Infection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **2014**; :ciu584–.

152. Stanford JL, Revill WD, Gunthorpe WJ, Grange JM. The production and preliminary investigation of Burulin, a new skin test reagent for Mycobacterium ulcerans infection. The Journal of hygiene **1975**; 74:7–16.

153. Pidot SJ, Asiedu K, Käser M, Fyfe JAM, Stinear TP. Mycobacterium ulcerans and other mycolactone-producing mycobacteria should be considered a single species. PLoS neglected tropical diseases **2010**; 4:e663.

154. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies. PloS one **2009**; 4:e7815.

# Annexes

## Annexe 1: Liste des articles publiés sur l'ulcère de Buruli dans des revues scientifiques

Kevin Carolan, Andres Garchitorena, Gabriel E García-Peña, Aaron Morris, **Jordi Landier**, Arnaud Fontanet, Philippe Le Gall, Gaëtan Texier, Laurent Marsollier, Rodolphe E. Gozlan, Sara Eyangoh, Danny Lo Seen, Jean-Francois Guégan (**2014**) ***Topography and land cover of watersheds predicts the distribution of the environmental pathogen Mycobacterium ulcerans***. In press, PLoS Neglected Tropical Diseases

**Jordi Landier**, Jean Gaudart, Kevin Carolan, Danny Lo Seen, Jean-François Guégan, Sara Eyangoh, Arnaud Fontanet, Gaëtan Texier (**2014**) ***Spatio-temporal Patterns and Landscape-Associated Risk of Buruli Ulcer in Akonolinga, Cameroon.*** PLoS neglected tropical diseases 8: 9. Sep.

V Pommelet, QB Vincent, M F Ardant, A Adeye, A Tanase, L Tondeur, A Rega, **J Landier**, E Marion, A Alcaïs, L Marsollier, A Fontanet, A Chauty (**2014**) ***Analysis of 81 osteomyelitis cases from a cohort of 1,257 PCR-confirmed Mycobacterium ulcerans infections in Benin.*** In press, Clinical infectious diseases

Andrés Garchitorena, Benjamin Roche, Roger Kamgang, Joachim Ossomba, Jérémie Babonneau, **Jordi Landier**, Arnaud Fontanet, Antoine Flahault, Sara Eyangoh, Jean-François Guégan, Laurent Marsollier (**2014**) ***Mycobacterium ulcerans Ecological Dynamics and Its Association with Freshwater Ecosystems and Aquatic Communities: Results from a 12-Month Environmental Survey in Cameroon.*** PLoS neglected tropical diseases 8: 5. May.

Richard O Phillips, Fred S Sarfo, **Jordi Landier**, Reid Oldenburg, Michael Frimpong, Mark Wansbrough-Jones, Kabiru Abass, William Thompson, Mark Forson, Arnaud Fontanet, Fatoumata Niang, Caroline Demangel (**2014**) ***Combined inflammatory and metabolic defects reflected by reduced serum protein levels in patients with Buruli ulcer disease.*** PLoS neglected tropical diseases 8: 4. Apr.

Tamara Giles-Vernick, Joseph Owona-Ntsama, **Jordi Landier**, Sara Eyangoh (**2014**) The puzzle of ***Buruli ulcer transmission, ethno-ecological history and the end of "love" in the Akonolinga district, Cameroon.*** Social Science & Medicine Mar.

Estelle Marion, **Jordi Landier**, Sara Eyangoh, Laurent Marsollier (**2013**) [***Buruli ulcer: a dynamic transversal research model performed through the international network of Pasteur Institutes***]. Médecine sciences : M/S 29: 10. 912-917 Oct.

Solange Meyin A Ebong, Sara Eyangoh, Estelle Marion, **Jordi Landier**, Laurent Marsollier, Jean-François Guégan, Philippe Legall (**2012**) ***Survey of water bugs in bankim, a new buruli ulcer endemic area in Cameroon.*** Journal of tropical medicine 2012: 05.

Annick Chauty, Marie-Françoise Ardant, Laurent Marsollier, Gerd Pluschke, **Jordi Landier**, Ambroise Adeye, Aimé Goundoté, Jane Cottin, Titilola Ladikpo, Therese Ruf, Baohong Ji (**2011**) ***Oral treatment for Mycobacterium ulcerans infection: results from a pilot study in Benin.*** Clinical infectious diseases 52: 1. 94-96 Jan.

Estelle Marion, **Jordi Landier**, Pascal Boisier, Laurent Marsollier, Arnaud Fontanet, Philippe Le Gall, Jacques Aubry, Noumen Djeunga, Alphonse Umboock, Sara Eyangoh (**2011**) ***Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon.*** Emerging infectious diseases 17: 3. 551-553 Mar.

**Jordi Landier**, Pascal Boisier, Félix Fotso Piam, Blanbin Noumen-Djeunga, Joseph Simé, Fidèle Gaetan Wantong, Laurent Marsollier, Arnaud Fontanet, Sara Eyangoh (**2011**) ***Adequate wound care and use of bed nets as protective factors against Buruli Ulcer: results from a case control study in Cameroon.*** PLoS neglected tropical diseases 5: 11. Nov.

Estelle Marion, Sara Eyangoh, Edouard Yeramian, Julien Doannio, **Jordi Landier**, Jacques Aubry, Arnaud Fontanet, Christophe Rogier, Viviane Cassisa, Jane Cottin, Agnès Marot, Matthieu Eveillard, Yannick Kamdem, Pierre Legras, Caroline Deshayes, Jean-Paul Saint-André, Laurent Marsollier (**2010**) ***Seasonal and regional dynamics of M. ulcerans transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors.*** PLoS neglected tropical diseases 4: 7. 07.

## Annexe 2 : Résultats de la recherche systématiques d'articles concernant la détection de Mycobacterium ulcerans dans l'environnement (chapitre 1, partie 2)

### Méthodologie

Afin d'obtenir une vue d'ensemble sur les travaux menés au sujet de la détection de MU dans l'environnement et sur les vecteurs, une recherche systématique de la littérature en anglais et en français, à partir de 1980, a été réalisée sur PubMed avec les mots clés ***("Mycobacterium ulcerans" OR Buruli OR "M. ulcerans") AND (PCR OR qPCR OR RT-PCR OR insect OR vector)***

Les travaux antérieurs à 1980 ne présentent pas les mêmes méthodologies (pas de PCR pour la détection de MU) et sont considérés à part.

### Résultats

Sur les 178 articles trouvés, 43 ont été conservés après élimination des articles non pertinents sur la base de l'examen du titre et du résumé.

| Motif d'élimination | n |
|---|---|
| diagnostic de l'UB chez les patients et/ou méthodes générales de détection de MU sans résultats d'application à l'environnement | 38 |
| études portant uniquement sur des sujets humains | 33 |
| études biologiques ou immunologiques au labo | 21 |
| revues généralistes sur l'UB, commentaires, ou autres articles ne présentant pas de recherche originale | 21 |
| à propos d'un cas | 9 |
| ne portant pas directement sur MU | 9 |
| Epidémiologie sans rapport avec transmission ou facteurs de risque | 2 |
| Inclus dans cette thèse ou associés | 2 |
| **Total éliminés** | **135** |

## Annexe 3 : Matériel supplémentaire pour l'article "Wound Care, Bed Nets and Buruli ulcer in Cameroon" (Chapitre 2, partie 1.2)

### Text S1: Details on multivariate analysis (multivariable conditionnal logistic regression) for case-community matched control analysis of risk factors for Buruli ulcer in Bankim, Cameroon, 2007-2009.

Results of the univariate analysis are shown in table 1 to 4. Twenty-nine variables came out with associations characterised by P values less than 0.25. When two of these variables were highly correlated, they were tested simultaneously against the dependent variable in the same conditional logistic regression model, and were kept for the building of the final model only if still significant at the 0.25 level when tested simultaneously. This led to the identification of 11 variables that were introduced simultaneously for the building of the final model. These variables were:

- Health related factors: Using soap for cleansing wounds, Frequently changing bandages
- Agriculture related factors: Growing cassava, Having a field at risk of inundation at the rainy season, Being wounded while clearing the fields, Watering a garden,
- Water related activities (other than fishing): Wearing shoes while collecting domestic water or washing clothes, Having baths for hygiene in the Mbam river,
- Insect related exposures: Systematically using a bed net, Reporting scratch wounds after insect bites,
- Habitation related factors: Presence of a water source near the habitation.

Variables were then removed starting by those with the highest P values until all variables left in the final model had P values less than 0.05. The variables were removed in the following order:

- Presence of a water source near the compound
- Wearing shoes while collecting domestic water or washing clothes
- Having a field at risk of inundation at the rainy season
- Frequently changing bandages
- Watering a garden
- Being wounded while clearing the fields

to keep only the five variables of the final model shown in Table 5.

Of note, confounding had limited impact, and only worked to decrease the magnitude of observed associations, as can be observed when comparing raw (univariate) and adjusted (multivariate) ORs: Using soap (0.1 unchanged), Scratch wounds after insect bites (2.1 to 2.7, respectively), Systematic use of a bed net (0.45 to 0.4), Growing cassava (0.4 to 0.3), and Having baths in the Mbam river (4.4 to 6.9).

**Table S2: Case-family matched control study analysis - Univariate and multivariate analysis results of risk factor analysis in Bankim, Cameroon, 2007-2009.**

**Table S2.1: Univariate analysis of selected demographic variables for Buruli ulcer disease in Bankim, Cameroon, 2007-2009. Family-matched case-control study.**

*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression

| Variable | | Cases | | Controls | | OR* | [95%CI]* | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Gender** | Men | 21 | (47) | 24 | (53) | 1 | Reference | 0.48 |
| | Women | 16 | (39) | 25 | (61) | 0.7 | [0.3-1.8] | |
| **Age (years)** | median [IQR] | 11 [9-16] | | 10 [7-14] | | Matching variable | | |
| **Main activity** | School | 24 | (65) | 36 | (73) | 1 | Reference | 0.61 |
| | Activity in the bush | 8 | (21) | 7 | (14) | 3.2 | [0.5-21] | |
| | Activity in the town | 3 | (8) | 3 | (6) | 2.3 | [0.3-25] | |
| | Child < 5 years | 2 | (5) | 3 | (6) | NA | NA | |
| **Fishing activity** | Y/N | 21 | (59) | 22 | (57) | 0.95 | [0.3-2.7] | 0.93 |
| **Farming activity** | Y/N | 29 | (78) | 40 | (82) | 0.8 | [0.2-3.7] | 0.8 |
| **Education level** | None | 7 | (19) | 8 | (16) | 1 | Reference | 0.70 |
| | Primary (or coranic) | 26 | (70) | 34 | (69) | 0.7 | [0.2-2.6] | |
| | Secondary | 4 | (11) | 7 | (14) | 0.3 | [0.04-2.9] | |
| **BCG scar** | Present Y/N | 15 | (41) | 27 | (55) | 0.6 | [0.2-1.4] | 0.2 |

**Table S2.2: Univariate analysis of selected individual variables (insect exposure, insect protection and wound care) for Buruli ulcer disease in Bankim, Cameroon, 2007-2009. Family-matched case-control study.**

*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression

| Variables | | Cases | | Controls | | OR* | [95% CI]* | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Insect bites** | | | | | | | | |
| **- Chrysops sp.** | Never | 3 | (8) | 7 | (14) | 1 | Reference | 0.40 |
| | Rare to often | 25 | (67) | 34 | (70) | 3.8 | [0.4-35] | |
| | Every day | 7 | (19) | 7 | (14) | 5.2 | [0.4-71] | |
| | Doesn't know | 2 | (5) | 1 | (2) | -- | -- | |
| **- Simulium sp.** | Y/N | 31 | (84) | 44 | (90) | 0.6 | [0.1-2.5] | 0.44 |
| **- cause scratch wounds** | Y/N | 26 | (70) | 28 | (57) | 2.3 | [0.8-6.7] | 0.11 |
| **Protection using :** | | | | | | | | |
| **- Mosquito coils (syst.)** | Y/N | 3 | (8) | 4 | (8) | 2 | [0.2-25] | 0.55 |
| **- Bed net (syst.)** | Y/N | 9 | (24) | 18 | (37) | 0.4 | [0.1-1.4] | 0.13 |
| | | | | | | | | |
| **Wound treatment habits** | | | | | | | | |
| **- use leaves** | Yes/No | 19 | (51) | 16 | (33) | 2.7 | [0.8-8.5] | 0.08 |
| **- use soap** | Yes/No | 33 | (89) | 36 | (73) | 0.6 | [0.1-2.8] | 0.54 |
| **- use alcohol** | Yes/No | 9 | (24) | 9 | (18) | 0.8 | [0.2-3.5] | 0.81 |
| **- use ointment** | Yes/No | 16 | (43) | 26 | (53) | 0.7 | [0.2-1.7] | 0.41 |
| **- no treatment** | Yes/No | 6 | (16) | 8 | (16) | 1 | [0.2-4.5] | 0.99 |
| **Treatment frequency** | No treatment | 4 | (11) | 10 | (20) | 1 | Reference | 0.28 |
| | ≤1 time/week | 10 | (27) | 12 | (24) | 2.7 | [0.6-12] | |
| | >1 time/week | 23 | (62) | 23 | (47) | 2.9 | [0.7-12] | |
| | ND | | | 1 | (2) | -- | -- | |
| **Dressing frequency** | No bandage | 19 | (51) | 20 | (41) | 1 | Reference | 0.31 |
| | ≤1 time/week | 5 | (14) | 11 | (22) | 0.3 | [0.1-1.5] | |
| | >1 time/week | 12 | (32) | 16 | (33) | 0.7 | [0.2-2.3] | |
| | ND | 1 | (3) | 2 | (4) | -- | -- | |

**Table S2.3: Univariate analysis of selected water exposure variables for Buruli ulcer disease in Bankim, Cameroon, 2007-2009. Family-matched case-control study.**

*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression

| Activities | | Cases | | Controls | | OR* | [95%CI]* | P* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Fish** | Never | 18 | (49) | 21 | (43) | 1 | Reference | 0.54 |
| | Rare to often | 8 | (22) | 15 | (31) | 0.5 | [0.1-1.9] | |
| | Every day | 11 | (30) | 13 | (27) | 0.8 | [0.2-2.7] | |
| **Bathe in water collections** | | | | | | | | |
| **-for hygiene** | Never | 9 | (24) | 15 | (31) | 1 | Reference | 0.60 |
| | Rare to often | 9 | (24) | 10 | (20) | 1.7 | [0.4-7.1] | |
| | Every day | 19 | (51) | 24 | (50) | 1.9 | [0.5-7] | |
| **Bathing place** | Barrage Y/N | 4 | (10) | 7 | (14) | 0.6 | [0.1-3.5] | 0.57 |
| | Mbam Y/N | 4 | (10) | 2 | (4) | 3.6 | [0.4-36] | 0.23 |
| | Other river Y/N | 19 | (51) | 27 | (55) | 0.8 | [0.2-2.9] | 0.75 |
| **-for leisure** | Never | 12 | (32) | 24 | (49) | 1 | Reference | 0.26 |
| | Rare to often | 10 | (27) | 8 | (16) | 2.5 | [0.7-8.8] | |
| | Every day | 15 | (41) | 17 | (35) | 2.3 | [0.7-7.7] | |
| **Bathing place** | Other river Y/N | 17 | (46) | 17 | (35) | 2.1 | [0.6-7.5] | 0.20 |
| **Wash clothes** | Never | 2 | (5) | 6 | (12) | 0.4 | [0.1-2.4] | 0.36 |
| | Rare to often | 32 | (87) | 41 | (84) | 1 | Reference | |
| | Every day | 3 | (8) | 2 | (4) | 2.9 | [0.3-29] | |
| **Carry water for household** | Every day | 21 | (57) | 31 | (63) | 1 | Reference | 0.82 |
| | Rare to often | 12 | (32) | 14 | (29 | 1.3 | [0.5-3.7] | |
| | Never | 4 | (11) | 4 | (8) | 1.4 | [0.3-7.0] | |

**Table S2.4: Univariate analysis of farming activity variables for Buruli ulcer disease in Bankim, Cameroon, 2007-2009. Family-matched case-control study.**

+children were considered having farming activities when they accompanied their parents to the fields;

*Odds-Ratio, 95% confidence interval and p-value obtained using conditional logistic regression

| | | Cases | | Controls | | OR* | [95%CI]* | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N | (%) | N | (%) | | | |
| **Farming activities+** | Y/N | 33 | (90) | 44 | (89) | 0.8 | [0.1-4.6] | 0.76 |
| **Cultures** | Corn Y/N | 33 | (90) | 44 | (89) | 0.8 | [0.1-4.6] | 0.76 |
| | Coffee Y/N | 12 | (32) | 16 | (33) | 1.1 | [0.2-5.6] | 0.89 |
| | Banana Y/N | 12 | (32) | 17 | (35) | 0.9 | [0.2-3.4] | 0.9 |
| | Cassava Y/N | 21 | (57) | 32 | (65) | 0.3 | [0.1-1.5] | 0.11 |
| | Ground-nut Y/N | 27 | (73) | 39 | (80) | 0.5 | [0.1-2.7] | 0.40 |
| | Beans Y/N | 6 | (16) | 9 | (18) | 0.9 | [0.2-4.6] | 0.9 |
| | Tubers Y/N | 23 | (62) | 36 | (73) | 0.3 | [0.06-1.3] | 0.08 |
| | Pepper Y/N | 4 | (11) | 4 | (8) | 1.3 | [0.2-8.0] | 0.8 |
| **Farming area** | Barrage Y/N | 9 | (32) | 17 | (35) | 0.2 | [0.02-1.7] | 0.08 |
| | | | | | | | | |
| **Own a "garden"** | Y/N | 16 | (43) | 17 | (35) | 2.7 | [0.5-13.5] | 0.21 |
| **Nearby compound** | Y/N | 6 | (16) | 8 | (16) | 1.6 | [0.1-18.3] | 0.69 |
| **Water garden** | Y/N | 14 | (38) | 14 | (29) | 3.2 | [0.6-16] | 0.13 |

**NB: Many variables related to fields had identical values for cases and controls since siblings usually went to the same fields (with their parents).**

**Table S2.5: Multivariable model for risk factors for Buruli ulcer disease in Bankim, Cameroon, 2007-2009. Family-matched case-control study.**

All variables with p-values<0.25 in univariate analysis were included in the multivariate analysis. These variables were: systematic use of bed net, cassava field, wash clothes in stagnant water, treats wounds with leaves, dressing frequency, works at a garden, bathes for leisure in a river, tuber field, shoes worn at the farm, bcg scar, scratch wounds after insect bites, field location near the dam lake. No variable was left after the stepwise variable elimination procedure. Variables were eliminated in order cited above.

**Supplementary figure S1:**

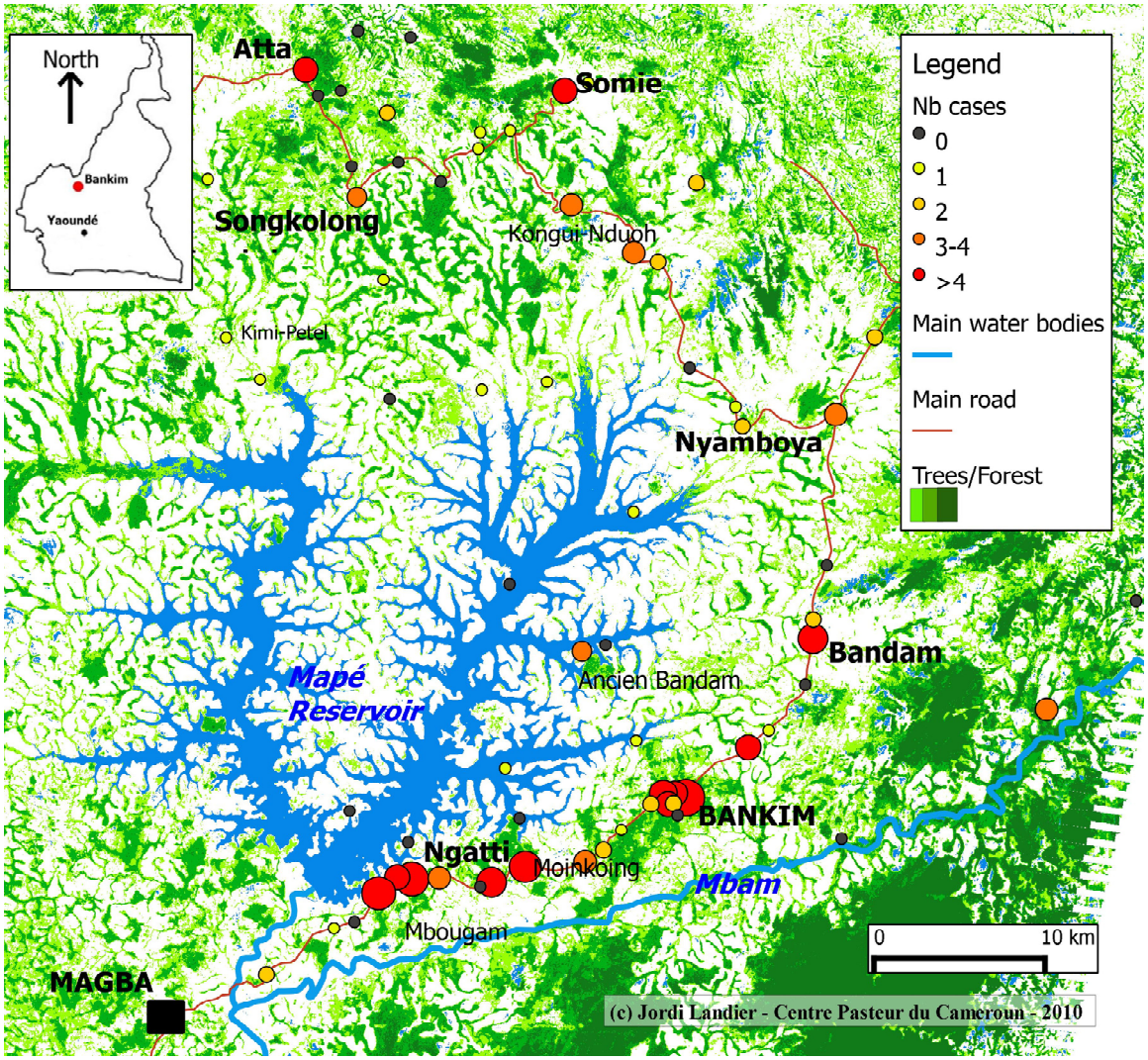



**Figure S1: Map of the Bankim area presenting the number of cases per village from January 2007 to August 2009** (dots proportional to the number of cases).
The map was realized using Quantum-GIS version 1.4. Locations of villages were recorded during the field study using a Garmin 6 GPS. Case numbers were obtained from the Bankim Hospital records. Approximate water and forest areas were isolated using an unsupervised classification algorithm (Multispec, version 3.1, Purdue research foundation) on a Landsat 7 multispectral image from 05 January 2007 (obtained from USGS website).