



**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES
MYCOBACTÉRIES NON TUBERCULEUSES À
L'INTERFACE
HOMME-ANIMAL-ENVIRONNEMENT ET
TRANSMISSION DE L'ULCÈRE DE BURULI DANS
LES ZONES ENDÉMIQUES DE CÔTE D'IVOIRE**

Christelle Yasmina Mahussi Dassi

► **To cite this version:**

Christelle Yasmina Mahussi Dassi. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES MYCOBACTÉRIES NON TUBERCULEUSES À L'INTERFACE HOMME-ANIMAL-ENVIRONNEMENT ET TRANSMISSION DE L'ULCÈRE DE BURULI DANS LES ZONES ENDÉMIQUES DE CÔTE D'IVOIRE. Bactériologie. Université Félix Houphouët Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire); N°ORDRE 1005 / 2016, 2016. Français. NNT: . tel-02417058

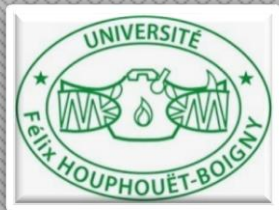
HAL Id: tel-02417058

<https://theses.hal.science/tel-02417058>

Submitted on 18 Dec 2019

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.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail



Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique

Année Universitaire

2014-2015

Numéro d'ordre

1005 / 2016

Soutenue publiquement

Le, 15 Février 2016

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de

L'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Spécialité : Biologie fonctionnelle et moléculaire

Mlle DASSI Christelle Yasmina Mahussi

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES MYCOBACTÉRIES NON TUBERCULEUSES À L'INTERFACE HOMME-ANIMAL-ENVIRONNEMENT ET TRANSMISSION DE L'ULCÈRE DE BURULI DANS LES ZONES ENDÉMIQUES DE CÔTE D'IVOIRE

Commission du jury

M. N'GUESSAN J. David	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. DJAMAN A. Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
M. BONFOH Bassirou	Maître de Recherches	CSRS	Co-Directeur
M. KAROU T. Germain	Maître de Conférences	UFHB	Rapporteur
Mme Cisse-Camara M.	Maître de Conférences Ag	UFHB	Rapporteur
M. LUTY Adrian	Directeur de Recherches	IRD	Examineur

DEDICACE

Le fruit du présent travail est dédié à notre famille et à nos proches. Nous les remercions infiniment pour leur soutien et assistance sans faille depuis le début de ce travail jusqu'à maintenant.

AVANT-PROPOS

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'un projet inter - et transdisciplinaire portant sur les risques de transmission des mycobactéries non tuberculeuses entre l'homme et les petits mammifères et la potentielle transmission de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire et au Ghana. Il est initié par le Consortium Africain de Recherches, Afrique One, "Ecosystème et Santé de la population : Extension des frontières en santé" avec le financement du Wellcome Trust (WT087535MA).

Ce travail est également le fruit d'une collaboration entre le Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS) et l'Université Félix Houphouët Boigny d'Abidjan (UFHB) à travers son Unité de Formation et de Recherche (UFR) en Biosciences.

Cette étude porte sur le volet biologie moléculaire dudit projet et s'intéresse à la caractérisation moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses depuis l'environnement jusqu'à l'homme au sein de cinq localités endémiques de l'ulcère de Buruli dans les départements de Daloa et Tiassalé en Côte d'Ivoire.

Ainsi, cette étude vise à apporter une meilleure compréhension des caractéristiques et des modes de transmission des mycobactéries non tuberculeuses responsables d'infection chez l'homme, en particulier l'ulcère de Buruli. Par conséquent, l'élucidation de leur transmission permettra une anticipation des risques d'infection par des stratégies de prévention efficaces.

REMERCIEMENTS

Nos travaux ont été réalisés sous la codirection des Professeurs DJAMAN Allico Joseph, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny d'Abidjan (UFHB) et BONFOH Bassirou, Directeur du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS). Nous leur exprimons notre profonde reconnaissance pour la confiance qu'ils nous ont accordée. Leurs conseils, encouragements et disponibilités à chaque sollicitation, nous ont été d'une grande aide tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude au Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS), dont l'implication a été déterminante dans la réalisation de ce projet de recherche, à travers la mise à disposition des infrastructures, des laboratoires de biologie moléculaire pour la mise en œuvre des travaux et toute l'assistance technique et administrative de son personnel.

Cette étude a été menée dans le cadre du Consortium Afrique One et nous remercions son Directeur, Professeur BONFOH Bassirou, pour l'opportunité qui nous a été donnée d'intégrer ce consortium et de bénéficier de l'ensemble des renforcements de capacités proposés.

Un remerciement particulier s'adresse au Docteur MOSI Lydia, Chef du projet, pour sa supervision dans un cadre convivial et maternel. Sa patience, son ouverture d'esprit et sa rigueur dans le travail ont été pour nous des qualités qui nous ont été d'un grand appui.

Nos remerciements vont également à l'endroit de tous les membres du Consortium Afrique One, Docteurs OUATTARA Karim, CAILLEAU Aurélie, TRAORE SYLVAIN, Mme SALL Badiène Khady, un grand merci pour l'assistance et les conseils avisés dont nous avons bénéficié à vos côtés.

Nous remercions l'équipe des chercheurs (étudiants et post doc) associés au projet, Mademoiselle KONAN Danièle, Messieurs NARH Charles, QUAYE Charles, TANO Brou Marcellin, Docteurs AKPATOU Bertin, KOFFI Mathurin, FOKOU Gilbert, pour le précieux soutien, les suggestions et critiques durant la réalisation de ce travail.

Cette étude n'aurait pu être effectuée sans la collaboration des structures et institutions impliquées dans le domaine de la Santé et la lutte contre l'ulcère de Buruli ainsi que les populations rencontrées au sein des localités d'étude. Il s'agit de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

(IPCI), des directions départementales de la santé, du Programme National de lutte contre l'ulcère de Buruli (PNLUB), du personnel du centre de santé Saint-Michel de Zoukougbeu, du personnel soignant des centres de santé communautaires, des autorités traditionnelles et communautés de Zaïbo, Gorodi, Léléblé, Sokrogbo et Ahondo.

TABLE DES MATIERES

<i>DÉDICACE</i>	I
<i>AVANT-PROPOS</i>	II
<i>REMERCIEMENTS</i>	III
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES ABREVIATIONS.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
INTRODUCTION	1
I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1.1. Généralités sur les mycobactéries	8
1.1.1. Mycobactéries non tuberculeuses.....	10
1.1.2. Mode de transmission.....	11
1.1.3. Pathogénie et diagnostic.....	12
1.1.4. Mycobactéries productrices de mycolactone	13
1.1.5. Production et cytotoxicité de la mycolactone.....	15
1.2. Ulcère de Buruli	16
1.2.1. Historique, perception et impacts socio-économiques de la maladie.....	16
1.2.2. Epidémiologie	17
1.2.3. Transmission et écologie de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	18

1.2.4. Infections à <i>Mycobacterium ulcerans</i> chez les animaux.....	18
1.2.5. Pathologie clinique, diagnostic et traitement	19
1.2.6. Efforts de contrôle, priorités de recherche et politiques de mise en œuvre.....	22
1.3. Caractérisation moléculaire de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	23
1.3.1. Génome et marqueurs génétiques pour l'étude de la transmission de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	23
1.3.2. Outils génétiques pour l'étude sur la transmission	24
II - MATERIEL ET METHODES.....	28
2.1. Matériel	29
2.1.1. Matériel biologique	29
2.1.2. Matériel technique utilisé pour l'étude moléculaire.....	29
2.2. Méthodes	32
2.2.1. Concept 'One Health'	32
2.2.2. Autorisation éthique	34
2.2.3. Choix des sites d'étude.....	34
2.2.4. Description des sites d'étude.....	34
2.2.5. Questionnaire pour la détermination des points d'eau à échantillonner	40
2.2.6. Collecte des échantillons.....	40
2.2.7. Préparation des échantillons et analyse de laboratoire.....	52
2.2.8. Séquençage.....	58
2.2.9. Analyse statistique des données	60

III - RESULTATS.....	61
3.1. Distribution de <i>Mycobacterium ulcerans</i> au sein des communautés	62
3.1.1. Confirmation des cas d'infection cliniques au sein des communautés	62
3.1.2. Discrimination des isolats de <i>Mycobacterium ulcerans</i> identifiés et géotypage.....	66
3.2. Environnements comme potentiels réservoirs de mycobactéries non tuberculeuses	69
3.2.1. Identification des environnements aquatiques contaminés	69
3.2.2. Identification des potentiels réservoirs animaux au sein de l'environnement.....	75
3.3. Comparaison des isolats bactériens identifiés et modèle de transmission	83
IV - DISCUSSION.....	87
4.1. Identification des environnements aquatiques contaminés par les mycobactéries non tuberculeuses	89
4.2. Etablissement du profil moléculaire de <i>Mycobacterium ulcerans</i> au sein des populations	91
4.3. Identification de potentiels réservoirs animaux de <i>Mycobacterium ulcerans</i> au sein de l'environnement.....	93
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	96
Conclusion.....	97
Perspectives	98
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100
ANNEXES	I
PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE ET DU PROJET	I

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

BAAR : Bacille Acido-Alcool Résistant

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

bp : bases paires ou en français pb (paires de bases)

BSA : Bovine Serum Albumin

CDS : Coding Domain Sequences

CNER : Comité National d'Ethique et de la Recherche

CSRS : Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire

DDBJ : DNA Data Bank of Japan

DNA : DeoxyriboNucleic Acid

16S rDNA : 16S ribosomal DeoxyriboNucleic Acid

EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid

EMBL : European Molecular Biology Laboratory

ER : Enoyl Reductase

g : gravité (relative à la force de centrifugation)

GBUI : Global Buruli Ulcer Initiative

G + C : Guanine + Cytosine

HDSS : Health Demographic Surveillance System

IS : Insertion Sequence

KR : Keto Reductase

Kpb : kilo paire de bases

MAC : *Mycobacterium avium* Complex

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

MIRU1 : Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit 1

mM : millimolaire

mlsA1 : Macrolide-Lincosamide-Streptogramin A1

mlsA2 : Macrolide-Lincosamide-Streptogramin A2

mlsB : Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses

MPM : Mycobactéries productrices de mycolactone

NaCl : Chlorure de Sodium

NCBI : National Center for Biotechnology Information

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : paire de bases

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PNLUB : Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli

RNA : RiboNucleic Acid

16S rRNA : 16S ribosomal RiboNucleic Acid

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SODECI : Société de Distribution d'Eau en Côte d'Ivoire

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

ST1 : Sequence Type 1

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TBE : Tris Borate EDTA

Tris : Tris Hydroxy Méthyl Amino Méthane

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

U : unité

UB : Ulcère de Buruli

VNTR : Variable Number Tandem Repeats

WHO : World Health Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation génétique des domaines de la biosynthèse de mycolactone à partir des plasmides de certaines mycobactéries productrices de mycolactone	14
Figure 2 : Manifestations cliniques de l'ulcère de Buruli	21
Figure 3 : Schéma du concept 'One Health' (modifié) à l'interface Homme-Animal-Environnement.....	33
Figure 4 : Localisation des sites d'étude présentant le nombre de cas d'ulcère de Buruli ces quatre dernières années.....	36
Figure 5 : Carte départementale de Daloa.....	37
Figure 6 : Carte de la Sous-préfecture de Taabo	39
Figure 7 : Quelques points d'eau échantillonnés et utilisés par les communautés.....	41
Figure 8 : Prélèvements d'échantillons chez les cas d'infection cliniques.....	43
Figure 9 : Exemples de matrices environnementales collectées.....	46
Figure 10 : Installation de pièges Sherman au sein des localités pour la capture des rongeurs	49
Figure 11 : Séquence d'insertion IS2404 et gène ER dans les fragments d'ADN des échantillons prélevés des cas d'infection cliniques.....	64
Figure 12 : Amplification des gènes d'intérêt des fragments d'ADN des échantillons des cas d'infection cliniques.....	65
Figure 13 : Amplification des loci VNTR des fragments d'ADN des échantillons prélevés des cas confirmés.....	67
Figure 14 : Détection des mycobactéries non tuberculeuses au niveau des points d'eau.....	70

Figure 15 : Distribution des mycobactéries au sein des matrices environnementales	71
Figure 16 : Distribution des mycobactéries non tuberculeuses selon les localités	74
Figure 17 : Détection des mycobactéries non tuberculeuses après amplification du gène IS2404 à partir des lésions suspectes observées sur les petits mammifères	80
Figure 18 : Lésions suspectes externes observées sur des petits mammifères capturés au sein des communautés.....	82
Figure 19 : Modèle de transmission basé sur le concept ‘One Health’ à l’interface homme-animal-environnement.....	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt	31
Tableau II : Points d'eau échantillonnés en fonction des départements et localités	42
Tableau III : Répartition des échantillons cliniques collectés au sein des communautés.....	45
Tableau IV : Matrices environnementales collectées par point d'eau.....	48
Tableau V : Densité des petits mammifères capturés au sein des localités	51
Tableau VI : Programmes d'amplification des gènes d'intérêt	56
Tableau VII : Taille des produits d'amplification et nombre de répétition associé	59
Tableau VIII : Données cliniques sur les cas d'infection au sein des communautés	63
Tableau IX : Profil VNTR et géotypes des isolats issus des cas d'infection cliniques	68
Tableau X : Proportion des échantillons testés positifs en fonction des matrices environnementales.....	73
Tableau XI : Diversité de capture au sein des petits mammifères capturés	76
Tableau XII : Distribution par localité des petits mammifères présentant des lésions externes suspectes.....	77
Tableau XIII : Données sur les petits mammifères présentant des lésions suspectes.....	78
Tableau XIV : Identification des bactéries présentes au niveau des lésions testées positives chez les petits mammifères.....	81
Tableau XV : Identification des isolats bactériens présents au sein des localités	85

INTRODUCTION

Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ou mycobactéries environnementales sont des microorganismes ubiquitaires largement distribués dans l'environnement et présents dans une grande variété de réservoirs, notamment le sol, l'eau, les aérosols, les protozoaires, etc. (**van Ingen et al., 2009**). De même, il existe des agents pathogènes obligatoires aussi bien chez l'homme que chez l'animal tels que les mycobactéries responsables de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), de la lèpre (*M. leprae*) et *M. bovis*, à l'origine du vaccin BCG atténué, utilisé contre la tuberculose (**Chilima et al., 2006**).

Au sein de l'ensemble des espèces connues de mycobactéries, environ un tiers sont impliquées dans les cas de maladies chez l'homme (**Katoch, 2004**). Les MNT y compris le complexe *Mycobacterium avium* (MAC), *M. goodii*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, etc., provoquent des maladies chez l'homme sain ou immunodéprimé, mais également chez l'animal.

Par ailleurs, les mycobactéries productrices de mycolactone (MPM), sous-ensemble des MNT, sont d'une importance capitale en raison de leur pathogénicité. En effet, elles causent des ulcères invalidants chez l'homme et l'animal. Les MPM que sont *Mycobacterium pseudoshottsii*, *M. liflandii*, *M. xenopi* et *M. ulcerans* ont été isolées chez les poissons, les grenouilles et l'homme, respectivement (**Rhodes et al., 2001; Rhodes et al., 2005; Ranger et al., 2006**). D'autres études ont permis d'isoler des MPM chez les petits mammifères à savoir les opossums et koalas (**Mitchell et al., 1984; Fyfe et al., 2010**) et les animaux domestiques y compris les chats et les chevaux (**Elsner et al., 2008; van Zyl et al., 2010**).

L'ulcère de Buruli (UB) est une maladie nécrosante de la peau qui a d'énormes impacts socio-économiques sur les individus touchés ainsi que leurs familles et communautés. L'UB a une distribution tropicale et est endémique dans plus de trente pays principalement en Afrique notamment le Cameroun, le Togo, le Bénin, le Ghana et la Côte d'Ivoire avec des populations affectées essentiellement rurales (**van der Werf et al., 2005**). Environ 48% des cas sont déclarés chez les enfants âgés de moins de 15 ans et tous les sexes sont également touchés (**Marston et al., 1995; WHO., 2015**). La maladie a été décrite comme une maladie tropicale négligée mais traitable. Le micro-organisme pathogène, *Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*), qui fait partie des MPM, appartient à la même famille que les bactéries provoquant la lèpre et la tuberculose mais, a reçu moins d'attention (**Stienstra et al., 2002**).

Le mode de transmission étant encore mal connu, il est difficile de mettre en œuvre des stratégies de prévention et de contrôle efficaces. Les efforts de contrôle en santé publique ont donc mis l'accent sur la détection précoce des cas et la sensibilisation des populations et les recherches actives de cas dans les communautés endémiques (**Stienstra et al., 2002; Johnson et al., 2005**;

Kanga et al., 2005; Ahoua et al., 2009). Les activités socio-économiques autour des points d'eau et l'agriculture pratiquée près des rivières à courant lent dans les zones endémiques, ont été identifiées comme des facteurs de risque d'infection (**Marston et al., 1995; Asiedu et Etuaful, 1998; Debacker et al., 2006; Brou et al., 2008).**

En raison de la difficulté de mise en culture de *M. ulcerans* à partir d'échantillons aquatiques environnementaux (**Portaels et al., 2008**), les études se sont intéressées à la recherche du matériel génomique de *M. ulcerans* dans plusieurs matrices aquatiques, les insectes, et la corrélation avec la morbidité (**Williamson et al., 2008; Doannio et al., 2011; Williamson et al., 2012; Narh et al., 2015**). Des outils moléculaires plus précis tels que le typage des nombres variables de séquences nucléotidiques répétées en tandem, connues sous l'appellation anglo-saxonne 'Variable Number Tandem Repeat' (VNTR), mais également celui de la variation d'une simple paire de base d'une séquence d'ADN ou 'Single Nucleotide Polymorphism' (SNP) ont été développés (**Ablordey et al., 2005b; Roltgen et al., 2010**). Ceci permet de différencier de manière plus spécifique *M. ulcerans* des autres MPM vu le génome commun et la similarité de séquence plasmidique (**Yip et al., 2007**).

Les infections causées par ces mycobactéries entraînent de graves conséquences sur la morbidité et la mortalité chez l'homme et l'animal directement liées au profil socio-économique des collectivités touchées (**Asiedu et Etuaful, 1998**). L'un des facteurs de confusion affectant le contrôle et la prévention des infections par les MNT est leur nature opportuniste et le grand nombre de réservoirs possibles (sol, eau, aérosols, insectes, protozoaires et petits mammifères) (**Portaels et al., 1999; Portaels et al., 2001; Aiga et al., 2004**). Plus important encore, il a été démontré dans un certain nombre d'études que le mode de transmission des MNT dépendrait de la proximité de l'homme avec l'environnement de ces réservoirs notamment celui des animaux infectés (**Primm et al., 2004; van Ingen et al., 2009**).

Un grand nombre de recherches sur l'écologie de *M. ulcerans* mettant l'accent sur les possibles réservoirs, vecteurs et habitats, ont associé la bactérie aux cours d'eau à faible mobilité, étangs et zones humides. L'augmentation des cas d'UB dans les communautés affectées a été associée à des contacts fréquents avec les cours d'eau et zones humides infectés (**Marston et al., 1995; Raghunathan et al., 2005; Ahoua et al., 2009**). Les études qui ont détecté l'ADN de *M. ulcerans* et non la bactérie vivante, à cause de la difficulté de mise en culture (**Portaels et al., 2008**), ont corrélié la grande quantité d'ADN avec l'augmentation des cas d'UB (**Williamson et al., 2012**). Ainsi, si les patients sont infectés à partir des points d'eau contaminés par *M. ulcerans*, les isolats bactériens de ces patients devraient être génétiquement identiques aux isolats provenant des points d'eau auxquelles ils sont fréquemment exposés.

De plus, une grande partie des efforts de recherche ont porté sur la comparaison et la différenciation des isolats humains d'origines géographiques différentes (**Stragier et al., 2006; Ablordey et al., 2007; Kaser et al., 2009a**). Au Ghana, en utilisant seulement deux loci VNTR (ST1 et MIRU1), trois géotypes ont été identifiés dont un commun à d'autres pays d'Afrique et un autre ne circulant que dans une seule région de ce pays (**Hilty et al., 2006**). Par ailleurs, en utilisant 4 autres loci (1, 6, 9 et 33), différents géotypes ont été mis en évidence selon l'origine géographique des isolats testés notamment 2 en Asie et 1 en Afrique. Pour ce dernier, une certaine homogénéité a été observée à travers les isolats issus de diverses localités en Côte d'Ivoire révélant le géotype commun aux pays d'Afrique centrale et de l'Ouest (**Coulibaly-N'Golo et al., 2011**).

Selon toute évidence, les recherches sur la diversité génétique de *M. ulcerans* ont permis des avancées majeures. Toutefois, aucune avancée notable n'a été obtenue quant à la similitude entre les isolats environnementaux et ceux provenant de l'homme mais également le traçage de la source d'infection jusqu'aux environnements infectés. Il a été démontré que les MNT y compris *M. ulcerans* sont issues de l'environnement mais, leur transmission à l'homme n'est toujours pas clairement déterminée même si diverses hypothèses ont été proposées (**Marsollier et al., 2002; Eddyani et al., 2004; Fyfe et al., 2010; Merritt et al., 2010; Willson et al., 2013**).

Il a été montré que l'utilisation des VNTR pour le profilage de ces pathogènes, permettrait de suivre les chaînes de transmission de l'environnement vers l'homme à partir des points de contact avec l'environnement aquatique (**Williamson et al., 2008**). La combinaison de différents loci polymorphiques permettrait donc d'accroître la puissance de discrimination et ainsi de découvrir des géotypes supplémentaires dans l'environnement et chez l'homme. Par conséquent, pour mieux comprendre la transmission de ces bactéries à l'homme, il est impératif de comparer les isolats environnementaux et humains, déterminer les voies d'infection depuis les environnements infectés et identifier les possibles réservoirs ou vecteurs associés à leur transmission.

La problématique d'une zoonose possible n'ayant pas été résolue, une meilleure définition de la spécificité de l'hôte et l'écologie naturelle des MPM constitue une priorité de recherche. Aussi, existerait-il différentes MPM mais seuls les isolats identifiés seraient ceux produisant des mycolactones suffisamment puissantes pour causer des maladies chez l'homme et les animaux cités plus haut. Une meilleure compréhension de la distribution de MPM dans l'environnement serait donc une avancée importante pour stopper la propagation des maladies qu'elles causent, en particulier l'ulcère de Buruli (**Yip et al., 2007**).

Ainsi, plusieurs questions essentielles restent à relever en ce qui concerne l'épidémiologie des MNT. Il s'avère important de mieux comprendre la distribution des MNT au niveau des espèces et

réservoirs issus de l'environnement liés au risque d'infection chez l'homme. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'étudier l'épidémiologie de quelques espèces de MNT qui étaient jusqu'à récemment non cultivables dans des conditions bactériologiques standards.

Cependant, l'épidémiologie de certaines MNT d'importance majeure en santé publique, eu égard au risque de morbidité qu'elle représente, n'a pas été suffisamment prise en compte. Par conséquent, il est difficile de comprendre leurs possibles modes de transmission et donc de développer des mesures de contrôle et de stratégie de prévention efficaces. Les études concernant les voies de transmission des MNT, précisément *M. ulcerans*, doivent donc inclure l'échantillonnage systématique des environnements à risque identifiés, le génotypage et la comparaison des isolats issus de ces environnements à ceux retrouvés chez l'homme.

Dans l'optique de mener de telles investigations, un atelier a été organisé par le CSRS afin de faire l'état des lieux de la recherche sur l'UB en Côte d'Ivoire et ainsi d'en dégager et valider les nouvelles pistes de recherche.

Un projet de recherche inter et transdisciplinaire a été initié par le Consortium Africain de Recherches sur l'Ecosystème et la Santé de la population, 'Afrique One' avec le financement du Wellcome Trust ; ce projet s'intéressant aux "Risques de transmission des mycobactéries non tuberculeuses entre l'homme et les petits mammifères et la potentielle transmission de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire et au Ghana".

La particularité de ce projet, en ce qui concerne la recherche sur l'UB, est justifiée par l'utilisation du concept 'One Health' qui démontre l'importance d'une approche sanitaire holistique entre l'homme, l'animal et l'environnement afin de mieux définir, contrôler et prévenir les maladies. Cela fait appel à l'interaction de différentes disciplines pour leur apport en termes de santé ou d'économie des populations.

Ainsi, en s'insérant dans ce projet global inter - et transdisciplinaire, des investigations ont été effectuées à différents niveaux. En effet, le volet sociologique de ce projet a permis d'identifier, à travers des travaux de Master, les perceptions des facteurs de risques de transmission de l'UB dans les zones endémiques en Côte d'Ivoire (Konan *et al.*, publication en cours). De plus, une étude moléculaire a permis de retracer des isolats de MNT responsables d'infection chez l'homme et provenant de l'environnement proche, dans des localités endémiques de la région Ashanti au Ghana (Narh *et al.*, 2015).

Aussi, la présente étude vise-t-elle à répondre aux préoccupations soulevées ci-dessus quant à l'épidémiologie et la distribution des MNT, en particulier *M. ulcerans*, à travers la caractérisation

moléculaire de ces mycobactéries au sein de zones endémiques de l'UB en Côte d'Ivoire. Elle permettra de retracer les sources d'infection due à *M. ulcerans* et aux autres MPM chez l'homme en tenant compte des environnements à risques. La réalisation des objectifs permettra d'établir des corrélations entre la distribution de ces mycobactéries chez l'homme et dans l'environnement afin de mieux comprendre les modes de transmission possibles dans ces localités. Au demeurant, elle aidera à mieux orienter les politiques de contrôle et les mesures de prévention dans la lutte contre l'UB.

L'objectif général de cette étude vise à caractériser les MNT particulièrement *M. ulcerans* et les autres MPM à l'interface homme-animal-environnement dans cinq localités endémiques de l'UB. De manière spécifique, il s'agit de :

- Etablir le profil moléculaire de *M. ulcerans* au sein des communautés à travers la confirmation des cas d'infection cliniques rencontrés dans les centres de santé des localités endémiques.
- Identifier les environnements à risques incluant les potentiels réservoirs de MNT auxquels les populations sont exposées au sein des localités.
- Comparer les différents isolats et/ou fragments d'ADN de MNT identifiées afin de déterminer les possibles modes de transmission depuis l'environnement jusqu'à l'homme.

I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Généralités sur les mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* de la famille des Mycobacteriaceae, de l'embranchement Actinobacteria (Skerman *et al.*, 1980), comporte plus de 120 espèces identifiées (Tortoli, 2006), qui peuvent être regroupées en quatre groupes sur la base du taux de croissance et de la pigmentation (Runyon, 1959). Les mycobactéries du groupe Runyon I sont à croissance lente (temps de croissance supérieur à sept jours pour visualiser des colonies en sous-culture) et photochromogènes (colonies acquérant un pigment seulement en présence de la lumière) ; exemple de *Mycobacterium kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. pseudoshottsii* (Runyon, 1959), etc. Celles du groupe Runyon II sont à croissance lente et scotochromogènes (acquisition de la pigmentation dans l'obscurité ou la lumière) et comprennent *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* (Runyon, 1959), etc. Le groupe Runyon III est également à croissance lente mais non chromogène (pas de pigmentation). Dans ce groupe, on peut citer *M. xenopi*, *M. avium*, *M. ulcerans*, *M. haemophilium* (Runyon, 1959), etc. Enfin, celles du groupe Runyon IV sont des producteurs rapides (temps de croissance inférieur à sept jours pour visualiser des colonies) notamment *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, etc. (Grange, 1996).

Les espèces de mycobactéries appartenant à ces groupes et d'autres classifications connexes ont été largement étudiées par divers auteurs (Runyon, 1959; Owens, 1978; Grange, 1982; Grange, 1996; Falkinham, 1996; Rastogi *et al.*, 2001; Kankya *et al.*, 2011). Les caractéristiques phénotypiques et génotypiques de certaines mycobactéries sélectionnées selon leur importance clinique ont également été étudiées de manière approfondie (Tortoli, 2006). Les systèmes de classification décrits ci-dessus sont basés sur les caractéristiques phénotypiques, qui ne peuvent pas donner une identification précise de certaines espèces. Plus récemment, les progrès en microbiologie moléculaire ont permis aux myco-bactériologistes d'avoir une approche plus informative sur la taxonomie du genre. Le séquençage et les analyses phylogénétiques du gène ADNr 16S codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) (Chilima *et al.*, 2006), ainsi que l'hybridation de l'ADN par des séquences spécifiques d'espèces (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2009) et le polymorphisme par longueur de fragments de restriction (RLFP) de gènes mycobactériens amplifiés (Oloya *et al.*, 2008) ont résolu les ambiguïtés au niveau de l'identification des espèces étroitement liées. Ceux-ci ayant été précédemment décrits, à la suite des classifications phénotypiques, comme des isolats similaires. La taxonomie des espèces dans le genre a donc été remaniée et de nouveaux isolats ont été identifiés et caractérisés permettant l'amélioration du diagnostic des infections mycobactériennes.

Le genre *Mycobacterium* contient à la fois des agents pathogènes stricts et opportunistes qui sont responsables d'infection chez l'homme et l'animal. Parmi les pathogènes stricts de l'homme,

M. tuberculosis et *M. leprae* (les agents responsables de la tuberculose et de la lèpre, respectivement) entraînent une importante morbidité et mortalité, en particulier dans les pays en développement (Stienstra *et al.*, 2002). Les pathogènes opportunistes, notamment *M. avium*, *M. kansasii*, *M. simiae* et *M. haemophilium*, causent des maladies chez les patients immunodéprimés (Rastogi *et al.*, 2001). Les autres espèces pathogènes qui causent la maladie comprennent *M. ulcerans*, l'agent responsable de l'UB, et *M. marinum* qui provoque des granulomes chez le poisson (Mve-Obiang *et al.*, 2005; Broussard et Ennis, 2007). *M. scrofulaceum* a également été impliquée à la fois pour la lymphadénite cervicale chez les enfants et la tuberculose pulmonaire chez les adultes (Jogi et Tying, 2004). De même importance, *M. fortuitum*, *M. chelonae* et *M. abscessus*, ont été associées à des infections traumatiques et post chirurgicales de la plaie, des infections de la peau et des tissus mous ainsi que la maladie pulmonaire (Rastogi *et al.*, 2001). Plusieurs autres maladies mycobactériennes ont été documentées, y compris avec *M. bovis*, l'agent responsable de la tuberculose bovine, *M. paratuberculosis*, provoquant la maladie de Johne et *M. avium* causant des infections chez le porc et les volailles (Rastogi *et al.*, 2001).

Sur le plan bactériologique, la plupart des mycobactéries peuvent se développer sur les milieux de culture Lowenstein et la plupart des milieux standards (Yeboah-Manu *et al.*, 2004). Ils peuvent être identifiés par l'observation du taux de croissance, la formation de pigment, la pathogénicité chez l'animal, la réaction à la niacine et la sensibilité aux médicaments (Owens, 1978). La plupart des protocoles de laboratoire pour la culture des mycobactéries, à partir d'échantillons cliniques, comprennent la décontamination initiale avec des biocides, tel que l'hydroxyde de sodium, inhibant ou éliminant la majorité des micro-organismes dans des conditions où la plupart des mycobactéries survivraient (Chilima *et al.*, 2006; Kankya *et al.*, 2011). En revanche, la culture des mycobactéries à partir d'échantillons environnementaux est très difficile et induit un grand nombre de contaminations par d'autres micro-organismes à croissance rapide (Neumann *et al.*, 1997). Comparativement aux échantillons cliniques, le sol a un pH plus large et variable contenant à la fois des substances organiques et inorganiques, y compris les enzymes acellulaires, les oligo-éléments, ainsi que de nombreux organismes non mycobactériens. Ceux-ci peuvent résister aux procédures de décontamination et culture sélective et donc dégrader le milieu de culture et inhiber la détection par PCR (Chilima *et al.*, 2006). Les progrès récents en biologie moléculaire ont fourni bon nombre d'alternatives pour contourner certains de ces obstacles rencontrés avec la culture et l'identification phénotypique des espèces de mycobactéries (Shamputa *et al.*, 2004).

Les mycobactéries ne sont pas mobiles et sont de minces bacilles acido-alcool-résistants faiblement gram positif (Hett et Rubin, 2008). La cellule des *Mycobacterium* tout comme la

plupart des bactéries contient des inclusions cellulaires, exemple de *E. coli*, et possède une épaisseur de paroi qui lui confère une morphologie distincte comme la plupart des bactéries gram positif (**Hett et Rubin, 2008**). Une grande partie de la paroi cellulaire est constituée d'acides mycoliques et mycosides qui rendent la paroi cellulaire cireuse et hydrophobe (**Hett et Rubin, 2008**). En raison de la nature cireuse de la paroi cellulaire, les mycobactéries se retrouvent à l'interface air-eau où la matière organique est concentrée (**Wendt et al., 1980**) et se dispersent facilement dans les aérosols (**Falkinham, 2003b**). Elles forment des biofilms (**Islam et al., 2012**), elles sont virulentes et résistantes à certains antimicrobiens (**Grange, 1996**) et sont acido-alcool-résistantes (**Oloya et al., 2007**).

1.1.1. Mycobactéries non tuberculeuses

Par le passé, pour des fins cliniques, les mycobactéries ont été classés comme ‘mycobactéries tuberculeuses’, car ces espèces causaient des infections similaires à la tuberculose chez l'homme comme chez l'animal (**Owens, 1978**). Il s'agit de *M. tuberculosis*, *M. africanum* (épidémiologie liée à l'Afrique), *M. bovis*, *M. canettii*, et *M. microti* respectivement responsables de la tuberculose chez l'homme, le bétail, les ruminants et les rongeurs (**Grange, 1996**). Les autres mycobactéries ont été décrites comme mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses (**Owens, 1978**). Contrairement aux précédentes qui sont majoritairement des pathogènes obligatoires chez l'homme et l'animal, les MNT sont ubiquitaires et se retrouvent dans un large éventail d'habitats écologiques et de réservoirs y compris l'eau et le sol, les protozoaires, l'eau du robinet, les eaux usées des hôpitaux, les systèmes de plomberie, les eaux usées, etc. (**Primm et al., 2004**). Ils sont sans danger au niveau de l'environnement où ils vivent, bien que leur rôle spécifique n'y est pas clair, et ne provoquent des maladies que lorsqu'ils sont en contact avec un hôte sensible (**Primm et al., 2004**).

Comparativement au complexe *M. tuberculosis*, la plupart des MNT sont moins virulents et sont rarement transmises d'homme à homme (**Tortoli, 2006**). Cependant, elles représentent des causes majeures d'infection chez l'homme et l'animal immunocompétent et immunodéprimé. Plus de 90 espèces (**Runyon, 1959, 1960; Katoch, 2004**) ont été reconnues dont quelques unes qui ne sont pas impliquées dans les cas de maladie (**Tortoli, 2006**). Comme précédemment souligné, plusieurs auteurs ont étudié certaines MNT d'importance majeure en santé publique (**Tortoli, 2006**). Toutefois, dans cette étude, les MNT recherchées en priorité comprenaient *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. liflandii*, le complexe *M. avium*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* et d'autres espèces d'importance clinique.

1.1.2. Mode de transmission

Les MNT ou mycobactéries environnementales, contrairement aux membres du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, sont saprophytes ubiquitaires se retrouvant dans presque tous les habitats environnementaux, y compris le sol et l'eau naturelle (**Falkinham, 2009**) ainsi que l'eau potable (**Tortoli et al., 2001**), les eaux usées hospitalières, les systèmes d'eau et de plomberie des ménages (**Wallace et al., 1998**), la nourriture (**Yoder et al., 1999**), etc. Par conséquent, l'exposition de l'homme aux infections mycobactériennes inclut l'eau potable contaminée, l'eau naturelle, le sol et la nourriture comme indiqué ci-dessus.

Cependant, il existe un chevauchement important au niveau de l'eau où l'homme est exposé aux mycobactéries qui y sont contenues à travers la consommation de l'eau potable, les activités de loisirs telles que la natation et la baignade (**Primm et al., 2004**). Les aérosols générés au cours de ces activités pouvant également conduire à l'exposition de l'homme (**Primm et al., 2004**). Au niveau des points d'eau, les MNT se retrouvent à l'interface air-eau où la matière organique est concentrée, formant des biofilms et survivant aux températures extrêmes, aux désinfectants et biocides (**Falkinham, 2010**). Par conséquent, cela a entraîné l'émergence et la persistance de souches résistantes qui sont diffusées dans les réserves d'eau (**Tortoli et al., 2001**).

Les rapports d'une transmission des MNT d'homme à homme sont rares, ce qui suggère que l'eau représente un véhicule majeur de dissémination des MNT (**Tortoli, 2006**). Fréquemment, *M. avium* a été isolée à partir des points d'eau et a été impliquée en tant que source de l'infection chez l'homme (**Primm et al., 2004**). Tortoli et ses collaborateurs ont montré par l'analyse de séquences de la région hypervariable du gène mycobactériel ARNr 16S, que les isolats de *M. avium* issus de patients infectés par le VIH-SIDA étaient semblables à ceux provenant des sources d'eau auxquelles ils ont été exposés (**Tortoli et al., 2001**). Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs en utilisant des singes expérimentaux (**Mansfield et Lackner, 1997**). Ces résultats concordent avec d'autres travaux qui ont également démontré des similitudes d'isolats de *M. avium* entre les isolats de patients atteints du VIH-SIDA et leur nourriture (**Yoder et al., 1999**).

Bien que plusieurs études aient rapporté une forte prévalence de l'infection aux MNT chez les patients immunodéprimés (**Yoder et al., 1999; Tortoli et al., 2001; Cassidy et al., 2009**), tout âge et sexe confondu, particulièrement chez les patients atteints du VIH-SIDA, une plus forte prévalence de l'infection par *M. avium* chez les femmes que chez les hommes a été démontré ; celle-ci étant plus élevée chez les patients âgés de plus de 50 ans (**Cassidy et al., 2009**).

1.1.3. Pathogénie et diagnostic

Les MNT ont été impliquées dans une multitude d'infections à la fois chez l'hôte immunocompétent et immunodéprimé, principalement chez les patients infectés par le VIH-SIDA, à travers le monde. Plusieurs études suggèrent que les mycobactéries pathogènes sont des pathogènes intracellulaires capables de croître à l'intérieur des phagosomes et phagolysosomes et d'inhiber l'activité bactéricide des lysosomes lors de l'infection des macrophages ; exemple de *M. avium* (Frehel *et al.*, 1986a; Frehel *et al.*, 1986b). Cela permet aux mycobactéries de moduler le système immunitaire de l'hôte par la médiation de la sécrétion de cytokines et les fonctions effectrices des macrophages (Rastogi *et al.*, 1994). Certains composants de la paroi cellulaire mycobactérienne comme l'acide mycolique, le Wax-D, le “cord factor”, sont tous associés à la virulence et à la pathogénicité (Rastogi *et al.*, 2001). Les infections mycobactériennes partent des maladies pulmonaire et extra-pulmonaire (Falkinham, 2003a), des infections cutanées et de la peau (Bartralot *et al.*, 2000) jusqu'aux infections disséminées à la fois chez les hôtes immunodéprimés et immunocompétents aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Chetchotisakd *et al.*, 2007).

Le diagnostic des infections mycobactériennes comprend la coloration au Ziehl-Neelsen des bacilles acido-alcool résistants ou BAAR (Bartralot *et al.*, 2000), le taux de croissance et la pigmentation sur les milieux de culture Lowenstein-Jensen ou Middlebrook 7H9 (Radomski *et al.*, 2010), les tests biochimiques y compris la réaction à la niacine, l'activité de la catalase (Rastogi *et al.*, 2001) et les tests cutanés de l'antigène (Falkinham, 1996). Il peut être utilisé pour diagnostiquer la plupart des infections mycobactériennes. Il est intéressant de noter que bien que ces tests soient largement utilisés pour le diagnostic des cas cliniques, leur application à l'étude épidémiologique des déclenchements et épidémies des infections est limité.

Au niveau des études épidémiologiques, bien que nécessitant l'identification et la caractérisation du microorganisme responsable, les méthodes moléculaires fournissent des approches plus informatives et contournent les limites des identifications phénotypiques (Rastogi *et al.*, 2001). La détection par PCR de séquences spécifiques de l'ADN mycobactérien, comme le gène ARNr 16S, les séquences d'insertion (IS), la protéine de choc thermique (hsp 65), supplante les identifications phénotypiques car étant plus sensible, spécifique, rapide et moins laborieuse (Rastogi *et al.*, 2001).

Par ailleurs, le traitement des infections dues aux MNT ne suit aucune ligne directrice normalisée. Il se compose d'une combinaison de différents antimicrobiens dépendant en partie du profil de sensibilité des espèces pathogènes (Brown-Elliott *et al.*, 2012; van Ingen *et al.*, 2012). Divers macrolides antimicrobiens arrêtent la synthèse des protéines en inhibant l'activité peptidyl transférase du ribosome 50S des mycobactéries. Ils ont été utilisés avec succès dans le traitement de

différentes infections mycobactériennes (**Tartaglione, 1997**). La clarithromycine, l'azithromycine, l'éthambutol, la rifampicine, la ciprofloxacine, l'isoniazide, l'érythromycine ont été utilisés en combinaison avec d'autres médicaments antibactériens comme la streptomycine et d'autres sulfamides, pour traiter les infections à MNT à la fois chez l'hôte immunocompétent et immunodéprimé (**Tartaglione, 1997**). La durée des traitements pouvant être aussi longue que 6 à 9 mois (**Tartaglione, 1997**). Dans d'autres cas où l'infection touche la peau et les tissus mous (infection à *M. ulcerans*), la chirurgie (greffe de la peau) s'effectue normalement (**Asiedu et Etuafu, 1998**).

1.1.4. Mycobactéries productrices de mycolactone

Les mycobactéries productrices de mycolactone (MPM) sont un groupe émergent de MNT d'importance croissante en santé publique en raison des maladies dévastatrices qu'elles provoquent chez l'homme et l'animal (**Rhodes et al., 2001; Mve-Obiang et al., 2005; Broussard et Ennis, 2007; Stinear et al., 2007**). L'une des caractéristiques qui distingue les MPM des autres MNT est la production de la toxine mycolactone, une molécule ayant des propriétés cytotoxiques et immunosuppressives aussi bien *in vitro* que *in vivo* (**George et al., 2000; Dobos et al., 2001; Hong et al., 2008**). La mycolactone est codée par un plasmide au sein de la cellule de la mycobactérie. Seules quelques mycobactéries comme *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. liflandii* et *M. marinum* *DL*, ont été confirmées comme hébergeant des copies de ce plasmide (**Pidot et al., 2008**). Il a été suggéré que les MPM descendraient d'un ancêtre *M. marinum* et auraient acquis un grand plasmide circulaire leur conférant la capacité de produire la mycolactone, et par la suite, elles se seraient propagées à travers le monde chez différents hôtes (**Pidot et al., 2008**). La comparaison de séquences de plasmides de ces mycobactéries (**Figure 1**) a montré plus de 98% de similarité de séquence (**Pidot et al., 2008**).

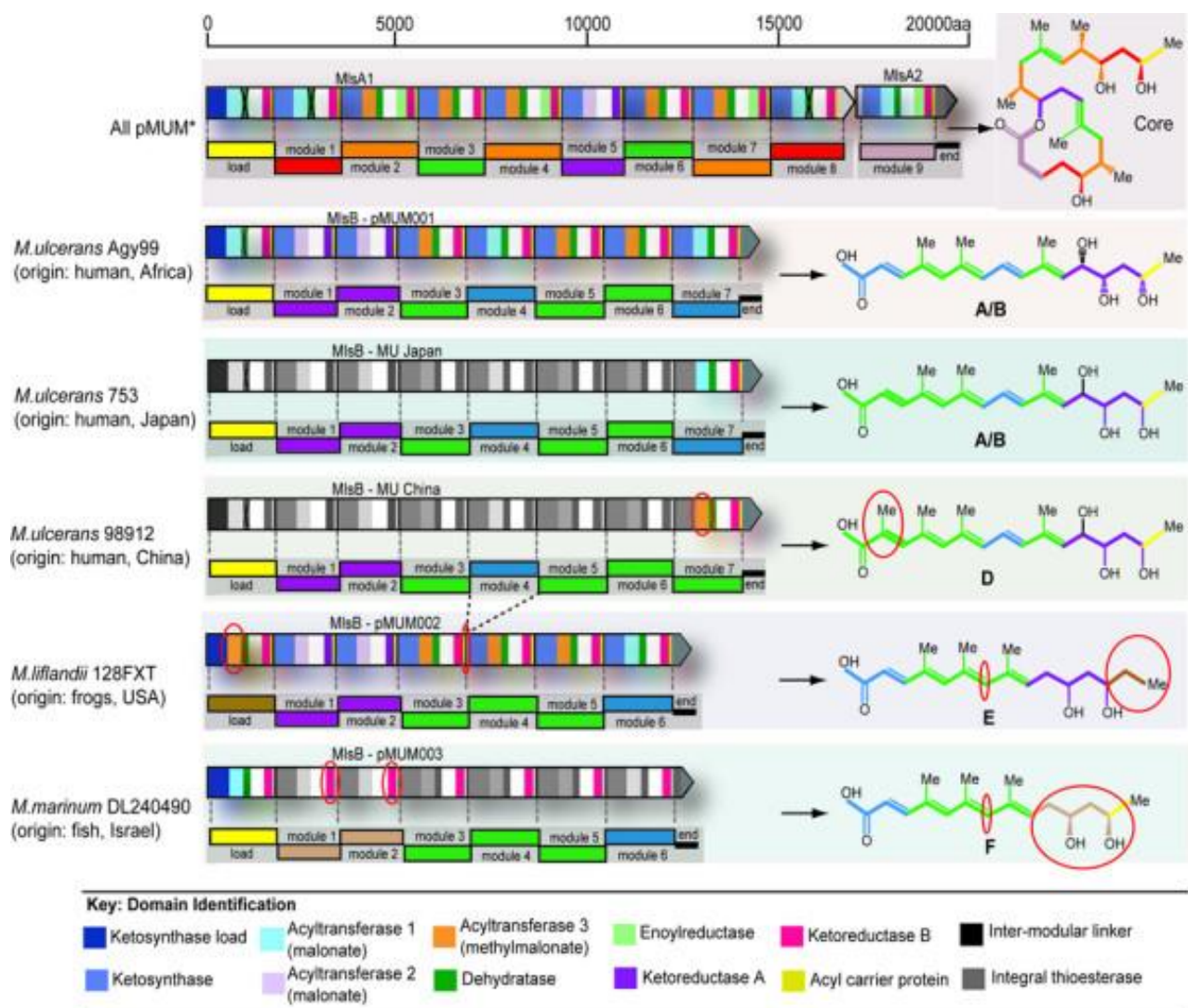


Figure 1 : Organisation génétique des domaines de la biosynthèse de mycolactone à partir des plasmides de certaines mycobactéries productrices de mycolactone

Source : (Pidot *et al.*, 2008)

En se basant sur cette information sur les séquences, les chercheurs s'intéressant aux mycobactéries ont conçu des amorces ciblant des sites de spécificité au niveau du plasmide ; cela afin de détecter les MPM à partir de sources cliniques et environnementales (**Williamson et al., 2008**). Les amorces ciblant les gènes codant les enzymes enoyl reductase (ER) et keto reductase (KR), impliquées dans la synthèse de la mycolactone, au niveau du plasmide pMUM001 de *M. ulcerans*, ont été utilisées pour détecter la bactérie dans des échantillons cliniques et environnementaux (**Williamson et al., 2008; Williamson et al., 2012; Yeboah-Manu et al., 2012**). Cependant, la différenciation précise des isolats de MPM s'appuie sur une combinaison d'autres outils moléculaires détaillés ci-après.

1.1.5. Production et cytotoxicité de la mycolactone

La mycolactone est produite par une réaction de condensation impliquant deux chaînes polykides, une chaîne de base (invariable quel que soit le type de mycolactone) et une chaîne latérale acyle (variable selon le type de mycolactone) comme décrit dans la **Figure 1** (**Pidot et al., 2008**). La première est produite par deux polykides synthétases codées par les gènes *mlsA1* et *mlsA2* au niveau du plasmide. La seconde, la chaîne acyle d'acide gras est produite par une polykide synthétase différente codée par le gène *mlsB* (**Pidot et al., 2008**). Les différents modules (domaine de gènes contigus) annotés sur les plasmides (**Figure 1**) codent plusieurs enzymes lors de la synthèse des acides gras pour la production de mycolactone.

Plusieurs études *in vivo* réalisées sur différents modèles expérimentaux (cobayes et souris) (**George et al., 2000; Torrado et al., 2007a**) et des études *in vitro* sur des lignées cellulaires différentes (cellules adipeuses et fibroblastes) (**Dobos et al., 2001; Sarfo et al., 2010**) ont montré les activités cytotoxiques et immunosuppressives de la mycolactone. Dans l'infection à *M. ulcerans*, la mycolactone est responsable à la fois du caractère indolore (immunosuppresseur) et de la forme ulcéralive (nécrose) de la maladie (**Mve-Obiang et al., 2003**). Toutefois, son rôle dans la survie et la colonisation de *M. ulcerans* à travers les diverses niches environnementales n'est pas clair et a été débattu par quelques auteurs (**Marsollier et al., 2002; Marsollier et al., 2003; Marsollier et al., 2007; Mosi et al., 2008**).

1.2. Ulcère de Buruli

1.2.1. Historique, perception et impacts socio-économiques de la maladie

L'ulcère de Buruli (UB) est une maladie nécrosante de la peau qui a d'énormes impacts socio-économiques sur les individus touchés, leurs familles et les communautés (**Stienstra et al., 2002**).

En Afrique, la maladie est parfois décrite sous les appellations de 'maladie mystérieuse' (**Marston et al., 1995**), 'vilaine maladie, plaie chronique' (**Kibadi et al., 2007**) ou encore 'plaie incurable' (**Clancey et al., 1961**), 'mangeuse de chair, maladie du milieu rural, stigmatisation sociale' (**Marston et al., 1995; Asiedu et Etuaful, 1998**). Ces représentations sont attribuables aux mythes perçus sur la maladie (**Stienstra et al., 2002**), aux effets débilissants et handicaps associés, aux populations les plus touchées et aux cicatrices sociales laissées sur les individus et leurs familles.

C'est la troisième infection mycobactérienne la plus répandue après la tuberculose et la lèpre (**Walsh et al., 2010**). L'agent pathogène responsable, *M. ulcerans*, a été premièrement décrit par MacCallum et ses collègues, cité par (**Johnson et al., 2005**). A partir des années 1980, l'UB est devenu un problème de santé publique incitant l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) à établir l'initiative globale pour l'UB, Global Buruli Ulcer Initiative (GBUI) en anglais, en 1998 (**Amofah et al., 2002**). Ceci, afin de sensibiliser sur la maladie, améliorer l'accès au diagnostic précoce, au traitement et à la promotion de la recherche en développant de meilleurs outils pour le traitement et la prévention de l'UB selon l'OMS (**WHO., 2012**).

La maladie est répandue dans les régions tropicales et sous-tropicales d'Afrique, avec la plupart des cas en Afrique de l'Ouest. Elle affecte les populations dans les zones rurales où l'activité socio-économique prédominante est l'agriculture (**Marston et al., 1995; Brou et al., 2008**). Dans ces communautés, la plupart des personnes pensent que la maladie est causée par la sorcellerie, une punition pour les péchés ou à la suite d'une malédiction (**Asiedu et Etuaful, 1998; Aujoulat et al., 2003**). Par conséquent, certains patients ont recours au féticheur ou guérisseur spirituel pour le traitement (**Stienstra et al., 2002**). D'autres l'attribuent à des questions d'hygiène personnelle et donc ne cherchent pas de traitement médical. Comme la lèpre, la plupart des patients atteints de l'UB sont stigmatisés et marginalisés (**Adamba et Owusu, 2011**). Les enfants en particulier, abandonnent l'école et deviennent des fardeaux pour leurs familles.

Une étude a montré que le traitement par patient était de plus de 900 Dollars (**Asiedu et Etuaful, 1998**). Toutefois, le traitement de l'UB est actuellement gratuit dans la plupart des hôpitaux publics, notamment en Côte d'Ivoire. Celle-ci est également pris en charge par certaines

organisations non gouvernementales (ONG) dans l'exécution des programmes d'éducation et de traitement gratuits au sein des communautés endémiques (**Adamba et Owusu, 2011**).

1.2.2. Epidémiologie

L'UB a une distribution tropicale et subtropicale (**WHO., 2010**). La maladie est endémique dans plus de 30 pays dans le monde, principalement en Afrique de l'Ouest, notamment le Ghana, le Togo, le Bénin et la Côte d'Ivoire. Des cas ont également été signalés au Cameroun, au Mexique, en Papouasie Nouvelle-Guinée et en Asie du Sud-est (**WHO., 2008, 2010**). En Australie, la maladie est prédominante dans le Sud-est (**Johnson et Lavender, 2009**). Au Ghana, elle est endémique dans toutes les régions avec des cas enregistrés allant jusqu'à 1048 cas en 2010, les cas rapportés depuis 2011 étant en nette diminution (**WHO., 2014**).

La Côte d'Ivoire qui demeure le pays le plus touché par l'UB compte plusieurs régions endémiques et a connu un pic en 2009 avec 2679 cas enregistrés. Toutefois, il faut noter une diminution des cas depuis 2010 avec 2553, 1386 et 1039 en 2010, 2012 et 2013 respectivement (**WHO., 2014**). Compte tenu des sous-déclarations des cas, les chiffres rapportés pourraient être beaucoup plus élevés (**Amofah et al., 2002**).

La maladie affecte tous les sexes et les groupes d'âge, mais la majorité des cas sont observés chez les enfants de moins de 15 ans (**van der Werf et al., 1989; Marston et al., 1995**). Plusieurs raisons ont été avancées quant au groupe le plus à risque et affecté par l'UB. Aussi, lors des activités de loisirs, les enfants seraient-ils en contact avec des environnements humides et des points d'eau contaminés par *M. ulcerans* (**Asiedu et Etuaful, 1998; Marston et al., 1995; Stienstra et al., 2002**).

Bien que le mode de transmission ne soit pas encore clair, plusieurs hypothèses ont été proposées. Il est suggéré que les personnes seraient infectées par l'inhalation d'aérosols contenant les bactéries (**Johnson et Lavender, 2009**), l'inoculation par le biais de microtraumatismes cutanées (**Meyers et al., 1974**) ou par les piqûres de certains insectes aquatiques (**Portaels et al., 1999**).

Cependant, quelques facteurs de risque ont été identifiés. L'augmentation de l'incidence de l'UB a été associée au contact avec les cours d'eau à faible mobilité et les marécages (**Debacker et al., 2006**). Le rôle des insectes aquatiques dans la transmission de l'UB reste incertain mais il demeure encore une priorité de recherche (**Marsollier et al., 2002; Silva et al., 2007; Benbow et al., 2008**) ; ce qui est également le cas des petits mammifères (koalas, possums, rongeurs, etc.) comme l'ont mentionné d'autres études (**Durnez et al., 2010; Fyfe et al., 2010**).

1.2.3. Transmission et écologie de *Mycobacterium ulcerans*

Aucune transmission d'homme à homme n'a été rapportée pour l'UB et le mode de transmission de *M. ulcerans* de l'environnement à l'homme n'est toujours pas clarifié (**Johnson et al., 2005**). Comme toutes les MNT, *M. ulcerans* est une mycobactérie environnementale saprophyte (**Merritt et al., 2010**). Elle a été détectée dans plusieurs biotopes aquatiques et son abondance a été corrélée à l'augmentation de la charge de morbidité dans certaines communautés étudiées (**Williamson et al., 2008; Williamson et al., 2012**).

Il faut souligner que dans ces études, seul l'ADN bactérien a été détecté mais pas les bacilles vivants (**Merritt et al., 2010**). Cela s'explique par la difficulté de culture de *M. ulcerans* à partir de la plupart des échantillons environnementaux bien vrai que dans un cas, *M. ulcerans* ait été cultivé à partir d'un insecte aquatique (**Portaels et al., 2008**). Les analyses génomiques comparatives suggèrent que *M. ulcerans* serait probablement en train de passer d'une bactérie généraliste de l'environnement à une bactérie spécialiste s'adaptant au niche notamment chez l'hôte qu'est le mammifère (**Stinear et al., 2007**).

Au sein d'un environnement aquatique, *M. ulcerans* se retrouve à l'interface air-eau, formant des biofilms aux surfaces, et occupe probablement des micro-habitats pas directement exposés à la lumière mais aérés (**Stinear et Johnson, 2007**). Comme la plupart des MNT, *M. ulcerans* prolifère dans les milieux aquatiques ayant un pH qui varie entre 5,5 et 6,5 (**Radomski et al., 2010**). Quelques études ont suggéré que la bactérie pourrait être transmise à des hôtes sensibles via des aérosols générés par les activités au niveau de points d'eau contaminés, l'inoculation par une peau ouverte ou même lors de la consommation d'eau contenant des bacilles (**Ross et al., 1997**).

Cependant, des études expérimentales testant ces hypothèses n'ont pas pu être affinées pour l'identification adéquate de modes spécifiques de transmission (**Merritt et al., 2010**). De telles études devraient s'appuyer sur les progrès de la biologie moléculaire afin d'identifier les habitats et les réservoirs de *M. ulcerans* contribuant à sa persistance et sa prolifération (**Williamson et al., 2012**). Les progrès en biologie moléculaire ont été utilisées pour remonter les sources d'infection, notamment celles causées par les MNT, jusqu'à des milieux particuliers (**Komijn et al., 1999; Tortoli et al., 2001**).

1.2.4. Infections à *Mycobacterium ulcerans* chez les animaux

Il a été suggéré que *M. ulcerans* ait évolué de *M. marinum* par l'acquisition d'un plasmide codant pour la mycolactone. Bien que l'infection à *M. ulcerans* soit en grande partie chez l'homme, des cas d'infection ont été signalés chez certains animaux (**Fyfe et al., 2010**). Des infections à *M. ulcerans*, avec des manifestations cliniques similaires à celles de l'homme ont été observées chez

les chats (Elsner *et al.*, 2008), les koalas (Mitchell *et al.*, 1984), l'opossum (Fyfe *et al.*, 2010), les chevaux (van Zyl *et al.*, 2010), la tortue (Sakaguchi *et al.*, 2011), le tatou (Walsh *et al.*, 1999). Dans chaque cas, la mycobactérie isolée était similaire à l'agent pathogène de l'homme, *M. ulcerans* (Fyfe *et al.*, 2010).

En outre, l'ADN de *M. ulcerans* a été détecté chez les mollusques, les crustacés et les moustiques (Kotlowski *et al.*, 2004; Marsollier *et al.*, 2004a; Johnson *et al.*, 2007). Des études expérimentales réalisées au Ghana ont montré que les aulacodes seraient sensibles à l'infection à *M. ulcerans* (Addo *et al.*, 2007).

Tous ces rapports et études suggèrent que les petits mammifères, vivant à proximité de l'homme ainsi que les animaux couramment chassés, comme les aulacodes, pourraient être de potentiels réservoirs de *M. ulcerans*, entraînant de futurs risques de zoonoses (Addo *et al.*, 2007). Ainsi le contrôle effectif de la maladie impliquerait, en partie, l'identification des réservoirs chez les animaux sauvages et domestiques.

1.2.5. Pathologie clinique, diagnostic et traitement

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente (temps de génération d'environ 52 heures). L'infection progresse lentement avec aucun signe visible de traumatisme (Hayman, 1985). La peau est une bonne cible pour l'infection de par sa température relativement faible qui favorise la croissance de la bactérie, à une température optimale de 28 à 32 °C (Hayman, 1985; Matsumura *et al.*, 2012). La production de mycolactone par *M. ulcerans* au cours de l'infection est en grande partie responsable de la pathologie associée à l'UB (George *et al.*, 2000). La molécule est à la fois immunosuppressive et cytotoxique, provoquant chez les patients de très infimes sensations de douleur dans la plupart des stades de la maladie (Hong *et al.*, 2008).

La maladie commence généralement par un nodule indolore (Figure 2) ou une papule sur la peau qui peut être confondu avec un bouton (WHO., 2012). Quand la maladie est diagnostiquée assez rapidement, quelques semaines d'antibiothérapie ou une excision chirurgicale permettent habituellement de stopper l'infection. La progression du stade de nodule conduit à une plaque indolore, un œdème et finalement une ulcération de la peau (Asiedu et Etuafu, 1998).

Bien que l'UB soit rarement mortelle, elle peut conduire à une invalidité permanente comprenant des rigidités, cicatrices et déformations des membres (WHO., 2012). La plupart des infections sont localisées, en particulier aux extrémités et aux parties plus froides du corps. Les cas de maladie systémique ou à diffusion sont rares, la température de 37°C étant défavorable pour la croissance de la mycobactérie (Matsumura *et al.*, 2012).

Les examens histo-pathologiques de coupes colorées de lésions excisées ont montré que *M. ulcerans* est extracellulaire. Cependant, certaines études expérimentales ont observé des bactéries intracellulaires dans les macrophages, expliquant que cela pourrait être une phase transitoire lors de l'infection (**Torrado *et al.*, 2007b; Schutte *et al.*, 2009**).

Les centres de santé et les hôpitaux, dans les zones endémiques, ont été renforcés par les politiques en vue de mieux prendre en charge les cas d'UB, mais divers organismes et programmes viennent en relais sous l'égide du Ministère en charge de la Santé. Le diagnostic repose sur des examens cliniques et para cliniques. Le premier consiste à regarder simplement les signes cliniques associés à la maladie tandis que le second utilise divers tests de laboratoire pour confirmer le diagnostic.



Figure 2 : Manifestations cliniques de l'ulcère de Buruli
 (A) nodule, (B) plaque, (C) œdème diffus, (D) large ulcère.
 Sources : Etuaful S., Ghana ; Assé H, Côte d'Ivoire

Les prélèvements par aspiration à l'aiguille fine et par écouvillons peuvent être faits respectivement à partir des nodules et des ulcères suspectés pour les tests de laboratoire. La coloration de Ziehl-Neelsen pour les bacilles acido-alcool-résistants, la culture sur milieu Löwenstein-Jensen ou milieu Middlebrook 7H9, couplées aux tests biochimiques spécifiques et à l'examen histopathologique des coupes colorées de lésions excisées peuvent tous être utilisés pour le diagnostic (**Bretzel et al., 2005; Mensah-Quainoo et al., 2008; Yeboah-Manu et al., 2011b**). Cependant, la PCR est un test plus spécifique et sensible pour le diagnostic (**Mensah-Quainoo et al., 2008**). Le diagnostic précoce, en particulier au stade de nodule, facilite l'arrêt rapide de l'infection et empêche les complications associées à l'UB (**WHO., 2010, 2012**).

L'OMS recommande une antibiothérapie associant la rifampicine et la streptomycine ou l'amikacine pendant huit semaines comme traitement de première ligne pour toutes les formes actives. Dans le cas d'ulcères étendus, une chirurgie permet d'éliminer les tissus nécrosés, les défauts cutanés et les déformations, ainsi que des interventions pour réduire ou prévenir les handicaps (**WHO., 2000, 2012**). De plus, d'autres médicaments se sont révélés efficaces aussi bien *in vitro* que *in vivo* notamment la clarithromycine, la kanamycine, la cyclosérine, la lévofloxacine et l'enviomycine (**Nienhuis et al., 2010; Matsumura et al., 2012**).

Actuellement, il n'existe aucun vaccin pour l'UB bien que quelques études aient identifié des antigènes candidats pour le développement de vaccins (**Tanghe et al., 2008; Einarsdottir et Huygen, 2011**). Malgré la gratuité du traitement dans de nombreux pays endémiques, y compris la Côte d'Ivoire, la majorité des patients atteints de l'UB trouvent difficile le déplacement vers les centres de santé, en raison du mauvais état des routes, du manque de moyens de transport et de la stigmatisation (**Asiedu et Etuafu, 1998**).

1.2.6. Efforts de contrôle, priorités de recherche et politiques de mise en œuvre

L'initiative mondiale pour l'UB, (GBUI en anglais) a été créée par l'OMS en 1998, en vue de sensibiliser sur la maladie, d'améliorer l'accès au diagnostic précoce et au traitement et de promouvoir la recherche pour le développement de meilleurs outils pour le traitement et la prévention de l'UB (**WHO., 2012**). Les pays endémiques comme la Côte d'Ivoire ont adopté les lignes directrices de l'OMS afin de traiter et mieux prendre en charge les patients de l'UB (**WHO., 2000, 2012**). Cependant, dans les zones rurales, les patients privilégient l'automédication ou le recours à la médecine traditionnelle comme première alternative (**Ahoua et al., 2009**).

Certains organismes en collaboration avec le Ministère en charge de la Santé ont intégré au sein des communautés des zones endémiques, des programmes d'éducation et de sensibilisation sur les divers facteurs de risque conduisant à l'UB et la reconnaissance des signes de l'UB (**Kanga et**

al., 2005). De plus, des volontaires ou agents de santé communautaires ont été formés pour réaliser les premiers soins de base des ulcérations de patients (**Kanga et al.**, 2005).

La recherche sur l'UB a porté essentiellement sur le diagnostic et le traitement avec maintenant quelques études sur l'écologie et la transmission de *M. ulcerans* (**Benbow et al.**, 2008; **Mosi et al.**, 2008; **Williamson et al.**, 2008; **Merritt et al.**, 2010; **Williamson et al.**, 2012). Les études sur la transmission ont bénéficié des outils de la biologie moléculaire pour élucider les voies de transmission possibles (**Williamson et al.**, 2012; **Narh et al.**, 2015). Les études sur l'immunologie et l'interaction hôte-bactérie sont rares et relatives à la tuberculose et d'autres maladies importantes en santé publique.

Il y a donc nécessité de sensibiliser le public sur la maladie surtout au sein des communautés endémiques. Des financements plus importants sont également nécessaires pour développer des outils pour l'épidémiologie moléculaire. Ceci, afin de surveiller la transmission notamment un diagnostic amélioré et un renforcement de capacités au sein des universités et des laboratoires de recherche, en utilisant des approches de recherche multidisciplinaires.

1.3. Caractérisation moléculaire de *Mycobacterium ulcerans*

1.3.1. Génome et marqueurs génétiques pour l'étude de la transmission de *Mycobacterium ulcerans*

M. ulcerans possède deux réplicons circulaires, un chromosome Agy99 de 5631606 paires de bases (pb) et un plasmide pMUM001 de 174.155 pb (**Pidot et al.**, 2008). Le plasmide contient 4 copies de la séquence d'insertion IS2404 et 8 copies de IS2606, tous deux utilisés comme marqueurs génétiques (**Stinear et al.**, 1999; **Williamson et al.**, 2008). Il y a également les 81 séquences codantes de gènes ou coding domain sequences (CDS), dont l'enoyl reductase (ER) et la keto reductase (KR), deux enzymes permettant la biosynthèse de la mycolactone, aussi utilisées comme marqueurs génétiques. Le taux moyen de G + C y est de 62,5 % (**Stinear et Johnson**, 2007). Le chromosome quant à lui contient 209 et 83 copies des séquences d'insertion IS2404 et IS2606, respectivement et 4281 séquences codantes (CDS). Il a un taux moyen de G + C de 65,72 % (**Stinear et Johnson**, 2007; **Stinear et al.**, 2007).

Il existe de nombreuses séquences d'ADN, au sein de gènes fonctionnels et non fonctionnels, qui ont été utilisés pour différencier les isolats de *M. ulcerans* des autres MPM (**Ablordey et al.**, 2005a). Cela inclut les nombres variables de séquences nucléotidiques répétées en tandem (VNTR), notamment les loci 1, 6, 19, ST1, MIRU1 (**Ablordey et al.**, 2005b; **Roltgen et al.**, 2010) et quelques gènes de ménage pour le typage des séquences à multiple loci, multilocus sequence typing

(MLST). Le gène 16S rRNA (ARNr 16S) mycobactérien (codant le DNA 16S), d'une grande importance évolutive, a également été largement utilisé pour retracer des phylogénies et différencier des isolats de MNT (**Portaels et al., 1996; Clarridge, 2004; Janda et al., 2007**).

Les études sur la transmission utilisent des outils génétiques avancés mais limités, comparés à ceux pour les études sur le paludisme et la tuberculose, permettant de détecter l'émergence de souches de résistance et de réaliser des études épidémiologiques moléculaires (**Merritt et al., 2010**).

1.3.2. Outils génétiques pour l'étude sur la transmission

Les progrès en biologie moléculaire, génomique, protéomique et bioinformatique ont grandement accéléré et amélioré la recherche quant à la compréhension des mécanismes moléculaires de l'infection, la pathologie et le traitement de diverses maladies mycobactériennes, comme la tuberculose et l'UB (**Walsh et al., 2010**). Le séquençage du génome de la souche *M. ulcerans* Agy99 a considérablement amélioré les études sur le diagnostic et la transmission (**Stinear et al., 2000b**). Par conséquent, pour des raisons de diagnostic para cliniques et de recherche, différents outils génétiques ont été élaborés et documentés (**Merritt et al., 2010**).

1.3.2.1. Séquençage du gène 16S rRNA

Le gène 16S rRNA (ARNr 16S) mycobactérien (codant le 16S DNA) est d'une grande importance quant à l'évolution et a été largement utilisé pour retracer les phylogénies, différencier les isolats de MNT (**Portaels et al., 1996; Clarridge, 2004; Janda et al., 2007**) et résoudre les ambiguïtés en nomenclature bactérienne (**Janda et al., 2007**). Le gène 16S rRNA est d'environ 1,5 kpb et a des régions conservées et variables à travers différents taxons (**Clarridge, 2004**).

Des amorces universelles ou spécifiques des espèces de mycobactéries, complémentaires de régions conservées sont utilisées dans une réaction PCR pour amplifier un segment de 500 pb ou 1500 pb du gène 16S rRNA. Les comparaisons des séquences de 500 pb ou 1500 pb à des séquences publiées peuvent être utilisés pour identifier les isolats au niveau de l'espèce et générer des arbres phylogénétiques avec des topologies similaires (**Clarridge, 2004**). Cet outil a été utilisé dans différents domaines pour une confirmation précise de la maladie et l'étude sur la transmission (**Portaels et al., 1996; Janda et al., 2007**).

1.3.2.2. Amplification des séquences d'insertion IS2404 et IS2606 et analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction

Les analyses des séquences du génome de la souche de référence *M. ulcerans* Agy99 ont révélé que les séquences d'insertion IS2404 et IS2606 sont présents en abondance aussi bien sur le

chromosome que le plasmide (**Pidot et al., 2008**). Par conséquent, les amorces ciblant ces séquences ont été conçues pour être utilisées dans la détection par PCR de *M. ulcerans* au niveau des isolats cliniques, vétérinaires et environnementaux (**Stinear et al., 2000a; Phillips et al., 2005; Ranger et al., 2006; Yeboah-Manu et al., 2011a**).

L'analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) des produits amplifiés IS2404 a été utilisée pour géotyper *M. ulcerans* à partir de différents isolats géographiques (**Chemlal et al., 2001**). Basé sur l'analyse RFLP de IS2404, six géotypes distincts de *M. ulcerans* ont pu être différenciés et correspondaient aux différentes origines géographiques (**Chemlal et al., 2001**). Cependant, il a été démontré récemment que d'autres MPM hébergeraient des copies de IS2404 (**Suykerbuyk et al., 2007**). Ainsi, à des fins de recherche, le diagnostic définitif d'une infection à *M. ulcerans* devrait employer des marqueurs encore plus spécifiques.

1.3.2.3. Typage des séquences à multiples loci

Concernant le typage des séquences à multiples loci (MLST), les séquences de différents gènes de ménage sont comparées simultanément (**Stinear et al., 2000b**). L'analyse MLST d'isolats de *M. ulcerans* de différentes zones géographiques a donné six géotypes différents liés aux six zones géographiques que sont le Surinam, la Papouasie-Nouvelle-Guinée, le Mexique, la Chine, l'Afrique et l'Australie (**Stinear et al., 2000b**). Cela étant conforme aux résultats d'autres auteurs utilisant l'analyse RLFP de IS2404 (**Chemlal et al., 2001**). De même, des études de génomique comparative des génomes de *M. ulcerans* et *M. marinum* ont montré la récente séparation de *M. ulcerans* à partir de *M. marinum* par l'acquisition d'un plasmide (**Stinear et al., 2000b**).

1.3.2.4. Typage de nombre variable de séquences nucléotidiques répétées en tandem

Les nombres variables VNTR sont des emplacements dans le génome où de courtes séquences d'ADN se trouvent dans des répétitions en tandem (**Ablordey et al., 2005b**). Ces répétitions qui varient en nombre par génome peuvent être utilisées pour différencier les espèces apparentées. Au niveau de *M. ulcerans* et d'autres MPM, de nombreux VNTR ont été identifiés tant à l'intérieur des gènes fonctionnels que non fonctionnels, à des loci spécifiques dans le génome de référence de *M. ulcerans* Agy99 (**Ablordey et al., 2005a; Ablordey et al., 2005b**).

Des réactions d'amplification ciblant certains loci comme les loci 6, 19, MIRU1 et ST1, tous avec des répétitions variables, ont été utilisées avec succès pour différencier *M. ulcerans* d'autres MPM hébergeant la séquence d'insertion IS2404 (**Stragier et al., 2007**). Cette méthode a été utilisée pour résoudre l'homogénéité génétique apparente au sein des isolats géographiques.

Une étude menée au Ghana a suggéré la diversité génétique de *M. ulcerans* dans ce pays. En utilisant la combinaison de deux loci VNTR polymorphes (ST1 et MIRU1) sur 72 isolats d'Afrique dont 57 du Ghana, elle a révélé trois génotypes différents avec un regroupement clonale (**Hilty et al., 2006**). Dans cette étude, les auteurs ont rapporté deux isolats de *M. ulcerans* circulant dans la région Amansie ouest, nouvellement Amansie centre du Ghana. Un isolat ayant une répétition de 2 pour ST1 et 1 pour MIRU1, génotype (2, 1) et l'autre (1, 3).

Ceci suggère que l'addition d'autres loci polymorphes pourrait augmenter le pouvoir de discrimination révélant plusieurs génotypes, notamment dans des isolats environnementaux et humains, permettant ainsi de mieux comprendre les modes de transmission possibles entre l'environnement et l'homme.

1.3.2.5. Polymorphisme de nucléotide simple et analyse par microarrays

Le polymorphisme des nucléotides simples (SNP), détecte une mutation d'une paire de base au niveau d'un locus spécifique, révélant des variations génétiques entre les membres d'une espèce. En utilisant cet outil, différentes méthodes, depuis l'hybridation en passant par les méthodes enzymatiques jusqu'au séquençage, ont été employées.

En raison de l'absence actuelle de variabilité génétique parmi les isolats géographiques de *M. ulcerans*, une étude a utilisé l'analyse des SNP pour le génotype de 83 isolats africains de *M. ulcerans* ; des SNP qui différenciaient les isolats régionaux ayant été identifiées (**Kaser et al., 2009b**).

Suite à leur succès, d'autres auteurs ont développé une méthode de PCR en temps réel des SNP, afin de génotyper des isolats de *M. ulcerans* provenant de patients issus de différentes régions du Ghana (**Roltgen et al., 2010**). Les auteurs ont observé la dominance d'un complexe local et son regroupement le long de la rivière Densu, suggérant une possible transmission focale.

L'application à grande échelle du typage des SNP pour les études épidémiologiques impliquerait l'utilisation de puces à ADN (**Kaser et Pluschke, 2008**). Cette technique a été utilisée pour différencier *M. tuberculosis* de *M. bovis* BCG par l'identification des 18 régions de diversité (RD1-RD18) (**Behr et al., 1999; Gordon et al., 1999**).

1.3.2.6. Bases de données et outils bioinformatiques pour l'alignement de séquences

Les profils VNTR de quelques MPM ont été élucidés et publiés. Celles-ci peuvent être utilisées comme des isolats de référence pour correctement attribuer les nombres de répétition en fonction de la taille des produits de PCR (**Lavender et al., 2008; Williamson et al., 2008**).

Plusieurs bases de données sont actuellement disponibles avec des séquences partielles et complètes de nombreux génomes mycobactériennes. Ceux qui sont accessibles au public comprennent les bases de données de :

- NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/),
- EMBL (European Molecular Biology Laboratory) (www.ebi.ac.uk/embl/),
- DDBJ (DNA database of Japan) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>).

Les génomes de *M. tuberculosis*, *M. leprae* et *M. ulcerans* ont été déposés dans les bases de données publiques comme GenBank, TubercuList et BuruList. D'autres bases de données comme RIDOM, MicroSeq et RDP-II contiennent des séquences de certains MNT. Les informations de ces bases de données sont librement accessibles. Des progiciels comme Clustal X2, MEGA 5.1, PAUP, BLAST, Phylip et BIBI (**Clarridge, 2004**) et bien d'autres peuvent être utilisés pour les comparaisons de séquences et les études de phylogénie.

Stinear et ses collègues, dans une analyse comparative du génome de *M. ulcerans* et *M. marinum* ont montré des différences significatives dans la taille du génome, des séquences d'insertion et pseudogènes, déduisant la fonction des gènes putatifs à partir du génome bien étudié de *M. tuberculosis* (**Stinear et al., 2000b**). En alignant la séquence du génome de *M. ulcerans* Agy99 aux génomes étroitement liés, notamment *M. marinum*, *M. leprae* et *M. tuberculosis*, plusieurs marqueurs génétiques ont été identifiés et développés pour le diagnostic précis et les études sur la transmission (**Huber et al., 2008**).

II - MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique se compose de trois différents types d'échantillons collectés à savoir :

- Des prélèvements cliniques (écouvillons et aspirations à l'aiguille fine) issus de cas de patients atteints de l'UB;
- Des matrices environnementales (biofilms, filtrats d'eau, détritux de plantes, sols) issues des points d'eau fréquemment utilisés par les populations;
- Des prélèvements animaux (lésions suspectes et organes) issus des petits mammifères (rongeurs) capturés à proximité des points d'eau et des habitations.

2.1.2. Matériel technique utilisé pour l'étude moléculaire

2.1.2.1. Réactifs et appareils utilisés pour l'étude moléculaire

Le matériel utilisé pour la caractérisation moléculaire se compose de divers réactifs et appareils. Ainsi, les réactifs utilisés sont constitués :

- pour la préparation des suspensions bactériennes et la macération des échantillons d'organes animaux, d'un tampon PBS 1X;
- pour la coloration au Zielh - Neelsen, d'un kit de coloration (Laboratorios Conda, SA pronadisa) des BAAR (bacilles acido-alcool résistants);
- pour l'extraction de l'ADN,
 - *d'un kit d'extraction (QIAGEN Dneasy blood and tissue kit) pour les échantillons cliniques;
 - *de différentes solutions préparées au laboratoire pour les échantillons environnementaux et animaux. Ce sont un tampon de lyse (100 mM de Tris (pH 8), 50 mM d'EDTA, 500 mM de NaCl et 1,3 % de SDS) ; un tampon de neutralisation (5000 mM de d'acétate de potassium) ; un tampon de fixation (1000 mM de chlorhydrate de guanidine et 63 % d'éthanol absolu) ; un tampon de lavage 1 (100 mM de Tris (pH 8), 1 mM d'EDTA, 500 mM de NaCl et 63 % d'éthanol absolu) ; un tampon de lavage 2 (éthanol absolu) et un tampon d'élution (10 mM de Tris (pH 8) et 0,1 mM d'EDTA);
- pour la préparation du mélange réactionnel lors de l'amplification des gènes d'intérêt,
 - *d'eau stérile (Water for Molecular Biology, Millipore);
 - *d'une solution de BSA à 10 mg/mL (Thermo Scientific);
 - *de différents réactifs dont un tampon PCR (10X Dream Taq™ Buffer, MgCl₂, Thermo Scientific) ; une solution à 10 mM pour chaque désoxyribonucléotide (dNTP, Thermo

Scientific), une solution de Taq Polymérase à 5 U/ μ L (Dream Taq™ DNA polymerase, Thermo Scientific);

- pour l'électrophorèse des produits d'amplification, d'une solution d'agarose (Thermo Scientific), de tampon de migration (10X TBE Electrophoresis Buffer, Thermo Scientific), de bromure d'éthidium (BET) (amReSCO) et de l'ADN ladder, un marqueur de taille de fragments d'ADN (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).

Les appareils nécessaires pour l'extraction et la réalisation des amplifications sont constitués :

- d'un vortex (FB 15012 Top Mix, Fischer Scientific) pour l'homogénéisation des suspensions utilisées;
- d'une centrifugeuse pour les tubes de 15 et 50 mL (Labofuge 200, Heraeus SEPATECH) pour la séparation de différents constituants d'une suspension par la formation d'un culot et d'un surnageant;
- d'une micro-centrifugeuse réfrigérée pour les microtubes de 1,5 et 2 mL (AccuSpin Micro 17 R, Fischer Scientific) pour la séparation de différents constituants d'une suspension par la formation d'un culot et d'un surnageant;
- d'un microscope optique (LEICA DM 500, Leica) pour l'observation des BARR après coloration;
- d'un bain sec chauffant (LabAmor) pour l'incubation des échantillons à haute température;
- d'un thermocycleur programmable (A200 Gradient Thermal cycler, LongGene®) pour la réalisation de la réaction d'amplification;
- d'un générateur (Electrophoresis Power Supply, APELEX PS 608) pour la migration des produits d'amplification par électrophorèse;
- et d'un transilluminateur (Benchtop 2UV™ Transilluminator UVP) associé à une caméra (BioDoc-It™ Imaging System) pour la visualisation des produits d'amplification après l'électrophorèse.

2.1.2.2. Séquences des amorces des gènes utilisés pour l'amplification

Lors de la caractérisation moléculaire, des amorces (Inqaba Biotech) issues des gènes d'intérêt sont utilisées pour l'amplification par PCR. Les séquences de ces amorces ainsi que les différentes tailles de produits PCR associées sont énumérées ci-après (**Tableau I**).

Tableau I : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt

Amorce	Séquence sens et anti sens	Taille du produit d'amplification	Références
16S rRNA (ARNr 16S)	PA:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' MSHA: 5'-AAAAAGCGACAAACCTACGAG-3'	620 pb	(Hughes <i>et al.</i> , 1993)
IS2404 (réaction 1)	pGp1:5'-AGGGCAGCGCGGTGATACGG-3' pGp2: 5'-CAGTGGATTGGTGCCGATCGAG-3'	400 pb	(Ablordey <i>et al.</i> , 2012)
IS2404 (réaction 2)	pGp3: 5'-GGCGCAGATCAACTTCGCGGT-3' pGp4: 5'-CTGCGTGGTGCTTTACGCGC-3'	210 pb	(Ablordey <i>et al.</i> , 2012)
ER	F:5'-GAGATCGGTCCCGACGTCTAC-3' R:5'-GGCTTGACTCATGTCACGTAAG-3'	719 pb	(Williamson <i>et al.</i> , 2008)
*Locus 6	F-5'-GACCGTCATGTCGTTTCGATCCTAGT-3' R-5'-GACATCGAAGAGGTGTGCCGTCT-3'	454 à 678 pb	(Williamson <i>et al.</i> , 2008)
*Locus 19	F-5'-CCGACGGATGAATCTGTAGGT-3' R-5'-TGCGCAGCATCGAGTCTC-3'	288 à 512 pb	(Williamson <i>et al.</i> , 2008)
*MIRU 1	F-5'-GCTGGTTCATGCGTGGAAG-3' R-5'-GCCCTCGGGAATGTGGTT-3'	404 à 616 pb	(Williamson <i>et al.</i> , 2008)
*ST 1	F-5'-CTGAGGGGATTTACGACCAG-3' R-5'-CGCCACCCGCGGACACAGTCG-3'	369 à 585 pb	(Williamson <i>et al.</i> , 2008)

F : forward, amorce sens, **R** : reverse, amorce anti sens, **pb** : paires de bases

***** : taille du produit d'amplification variable selon le nombre de répétition pour ces amorces

2.2. Méthodes

2.2.1. Concept ‘One Health’

Pour cette étude, le concept ‘One Health’ est utilisé afin de mieux prendre en compte, en termes de santé, l’ensemble des composantes à l’interface homme-animal-environnement ainsi que les différentes interactions possibles. Cela a permis de mieux comprendre et identifier les possibles modes de transmission en vue d’un meilleur contrôle des maladies.

Ainsi, dans le modèle de transmission décrit ci-après (**Figure 3**), le chevauchement et le partage des écosystèmes entre l’homme, l’animal et les agents pathogènes créeraient des points de contact favorisant l’infection par ces pathogènes et leur transmission entre l’homme, l’environnement et l’animal.

Cette approche par son caractère inter - et transdisciplinaire s’appuie sur les connaissances de diverses disciplines et secteurs pour une meilleure interprétation et anticipation des phénomènes observés et un apport en valeur ajoutée pour les populations et les écosystèmes.

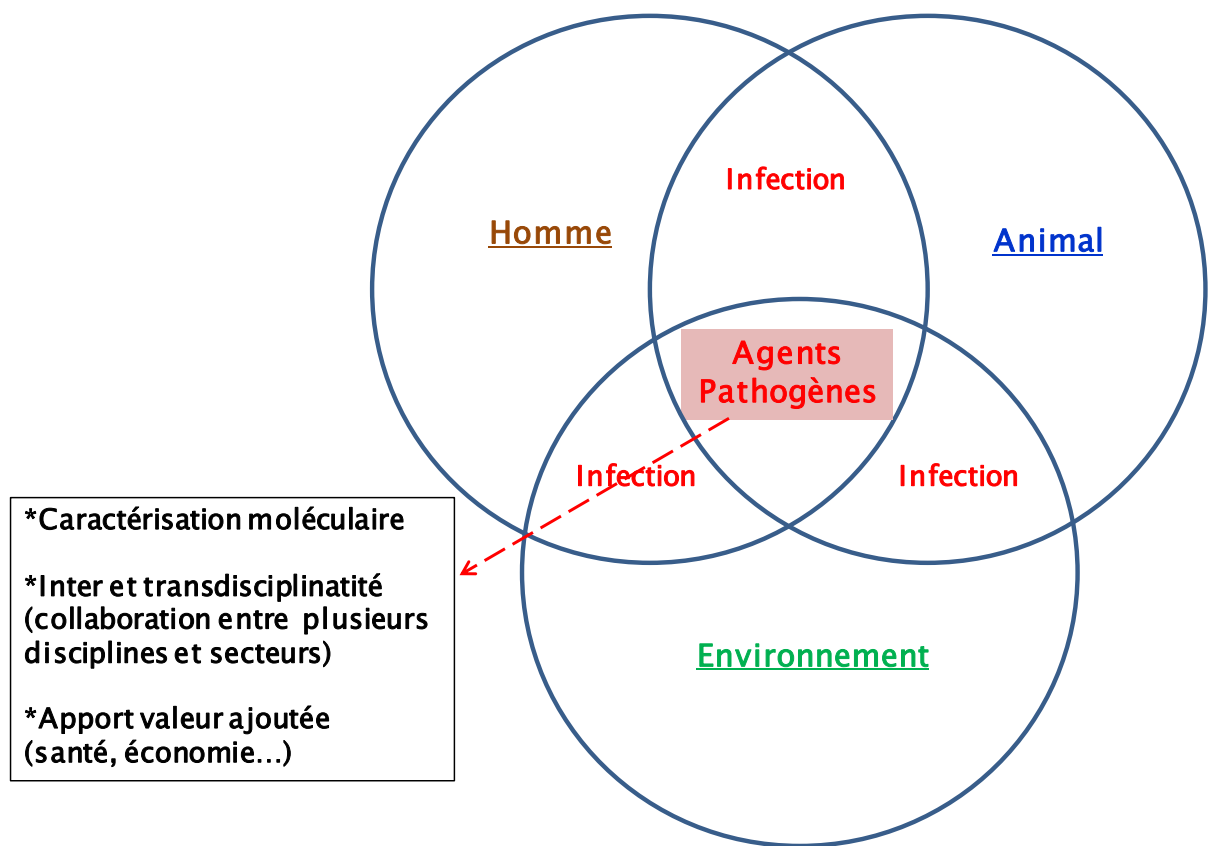


Figure 3 : Schéma du concept 'One Health' (modifié) à l'interface Homme-Animal-Environnement

2.2.2. Autorisation éthique

Cette étude a obtenu l’approbation du Comité National d’Ethique et de la Recherche (CNER) du Ministère de la Santé et de la Lutte contre le Sida (N° 3320/MSLS/CNER-P, Novembre 2011) au regard de l’implication de l’homme et des animaux lors de la collecte des échantillons (**Annexe 1**).

Lors des missions de prospection et validation des sites d’études ainsi que de collecte de données et d’échantillons, l’étude a été expliquée et traduite en langue locale aux différentes communautés. Les autorités locales et traditionnelles ont également donné leur accord quant à l’exécution de l’étude et la participation des populations.

Le consentement éclairé de chaque patient ou des parents dans le cas des enfants a été obtenu avant tout prélèvement, par la signature d’un formulaire de consentement après lecture de celui-ci (**Annexe 2**). La majorité des patients étant déjà pris en charge et intégrés à un protocole de traitement de l’UB au niveau du centre de santé, aucune mesure supplémentaire n’a été prise.

2.2.3. Choix des sites d’étude

Dans le cadre de cette étude, cinq localités ont été retenues au sein de deux grandes zones endémiques de l’ulcère de Buruli (UB) en Côte d’Ivoire à savoir le Centre-ouest et le Sud-est (**Figure 4**). Le choix des sites d’étude a été motivé par les données issues du programme national de lutte contre l’ulcère de Buruli (PNLUB) et de leurs profils endémiques pour l’UB.

Par ailleurs, les départements dont dépendent les localités sélectionnées ont subi des changements et réaménagements au niveau de l’environnement du fait de l’urbanisation, de la construction de barrages hydroélectriques, de l’introduction de l’exploitation agricole, forestière ou minière.

Ainsi, ces localités présentent des environnements aquatiques spécifiques notamment des cours d’eau à faible mobilité (barrages, étangs, marigots) pouvant favoriser la propagation des mycobactéries non tuberculeuses (MNT).

2.2.4. Description des sites d’étude

2.2.4.1. La zone de Daloa

Situé au Centre-ouest de la Côte d’Ivoire, dans la région du Haut Sassandra dont il est le chef-lieu, le Département de Daloa se trouve à 406 kilomètres d’Abidjan. Il est situé dans la zone forestière et est traversé par le fleuve Sassandra et ses affluents. Cela a favorisé le développement de diverses activités agricoles (cultures de café, cacao, palmier à huile, riziculture, etc.) et des

activités de pêche. Le Département de Daloa compte également plusieurs villages endémiques de l'UB dont ceux de Gorodi et Zaïbo sélectionnés pour cette étude (**Figure 5**).

Zaïbo (maintenant érigée en Sous/Préfecture) se situe à 20 kilomètres de Daloa et regroupe les quartiers Gamina, Bébo Niéssoko et Zaïbo. Sa population s'élève à 31429 habitants et est constituée majoritairement d'autochtones Niaboua, d'allochtones Baoulé, Gouro, Sénoufo, Yacouba et Guéré et d'allogènes Burkinabés, Maliens et Guinéens. Le village dispose de 5 pompes hydrauliques dont 2 fonctionnelles, de quelques puits et d'autres points d'eau utilisés par les communautés (Gbouwa, Tourou, la Lobo, etc.). Les activités socioprofessionnelles comprennent l'agriculture vivrière et des cultures de rente telles que le cacao, le café et l'hévéa. Il dispose d'un centre de santé auquel ont recours les malades de l'UB.

Gorodi se situe à 56 kilomètres de Daloa avec une végétation de forêt. Il regroupe les quartiers de Zagbeuzon, Dagoreuzon, Ponangbeu et Gorodi et dispose de deux pompes hydrauliques utilisées par la population lorsqu'elles sont fonctionnelles. Son réseau hydrographique assez développé, du fait de la présence du fleuve Sassandra, comprend des rivières et marigots entourant le village (Nidrou 1 et 2, Godo, etc.). La population estimée à 3575 habitants se compose d'autochtones Niaboua, d'allochtones Bété, Yacouba et Sénoufo, d'allogènes Burkinabés et Guinéens. Les activités agricoles sont constituées de culture de riz, manioc, banane, café, cacao, etc. La pêche y est également pratiquée.

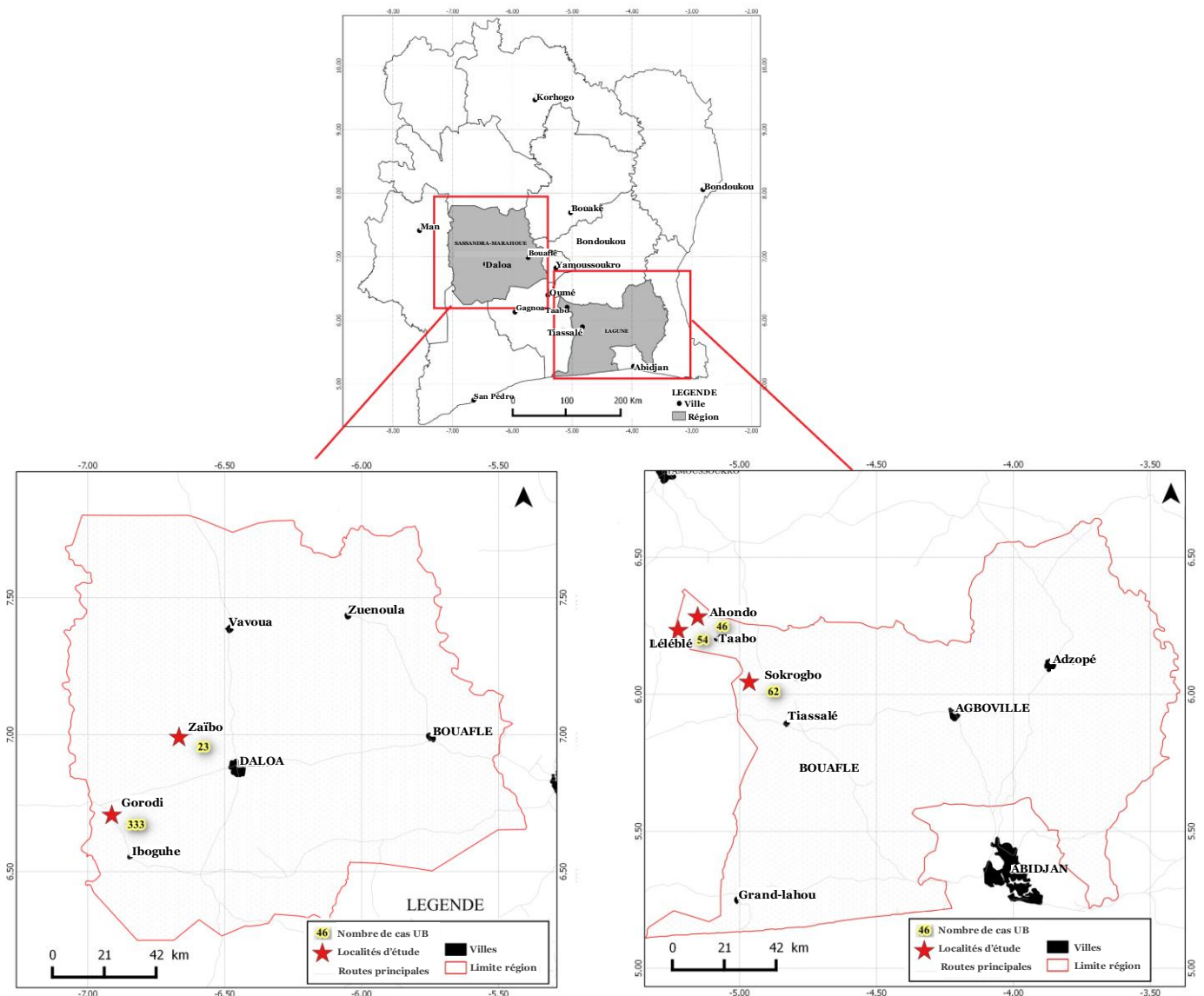


Figure 4 : Localisation des sites d'étude présentant le nombre de cas d'ulcère de Buruli ces quatre dernières années

Source: (Dassi *et al*, 2015)

Gauche : Centre-ouest, Département de Daloa avec les localités de Gorodi, Zaïbo ;

Droite : Sud-est, Département de Tiassalé (Taabo) avec les localités de Sokrobo, Léléblé et Ahondo.

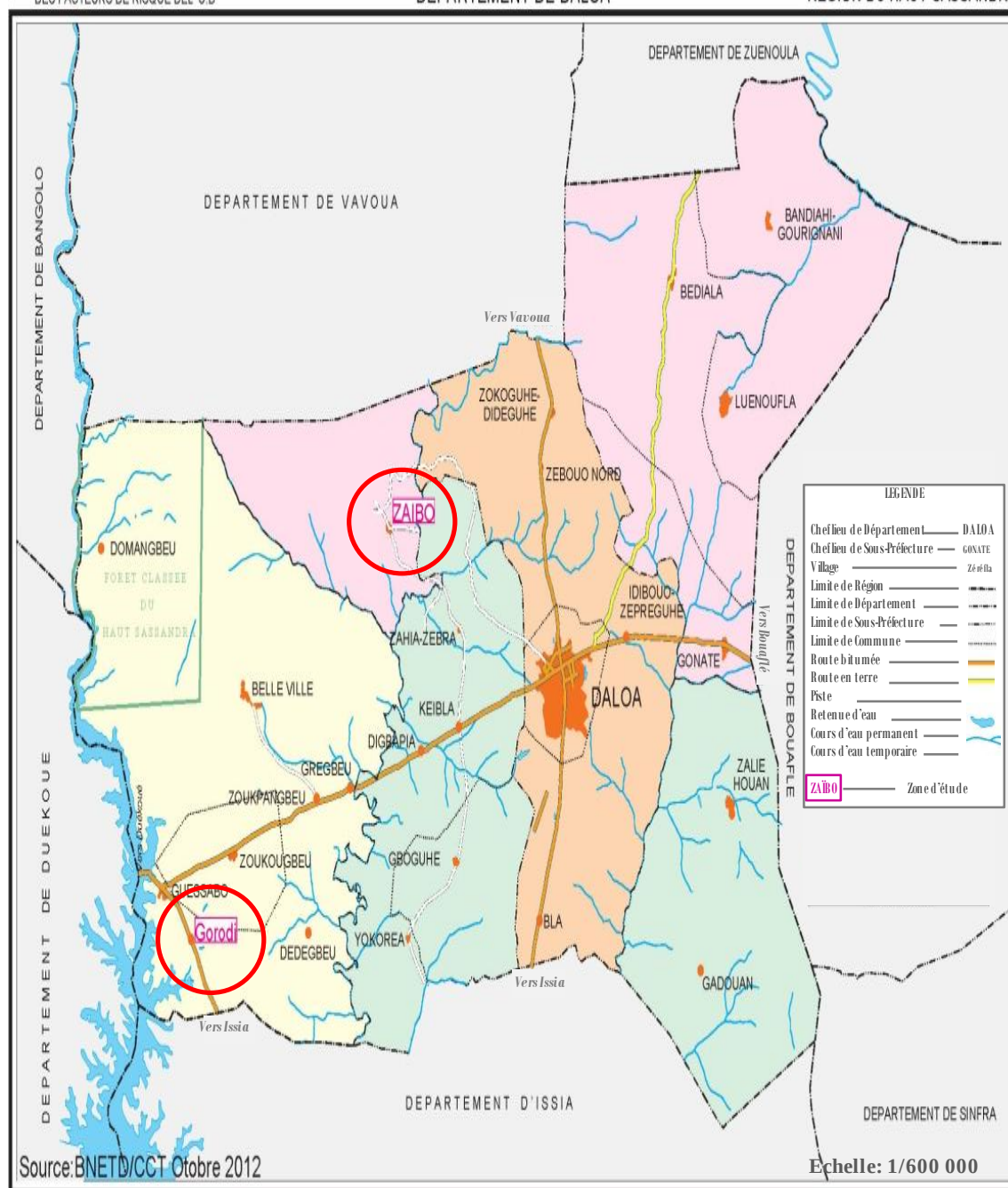


Figure 5 : Carte départementale de Daloa

Source: (BNETD Octobre 2012/Direction départementale de la santé de Daloa)

○ Localité sélectionnée

2.2.4.2. La zone de Taabo

Située au Sud-est de la Côte d'Ivoire et appartenant au département de Tiassalé, la ville de Taabo, maintenant érigée en préfecture, se trouve à 160 kilomètres d'Abidjan dans le département de Tiassalé. Elle est traversée par le fleuve Bandama et a connu plusieurs modifications environnementales notamment, la construction de barrage hydroélectrique (barrage de Taabo), l'urbanisation du fait des déplacements des populations, l'installation d'activités agricoles et autres activités socio-économiques, etc. La préfecture de Taabo couvre plusieurs villages parmi lesquels les villages de Sokrogbo, Léléblé et Ahondo retenus pour cette étude, en raison de leur situation épidémiologique connue de l'UB (**Figure 6**).

Sokrogbo est une commune rurale située à 45 kilomètres de Taabo. On y retrouve une végétation de forêt et de savane. Elle dispose d'un château d'eau et d'un réseau hydrographique comprenant, en plus du fleuve Bandama distant de 3 kilomètres, d'autres points d'eau (Barrage 1 et 2, Woudigné, etc.). Ceci favorise leur utilisation pour les activités domestiques, agricoles et de loisirs. La population dans cette commune est estimée à 2237 habitants et comprend les autochtones qui sont les Dida et les Baoulé Ahua. La communauté allochtone est composée de Baoulé, Agni, Attié, Sénoufo et Wobé et celle allogène de Burkinabés, Maliens et Ghanéens. Diverses activités y sont pratiquées notamment l'agriculture (café, cacao, hévéa, teck, palmier à huile), la pêche, l'élevage. Elle dispose d'un centre de santé qui enregistre de nombreux cas d'UB.

Léléblé est un village situé à 25 kilomètres de Taabo et se compose en majorité d'un relief de forêt. Situé en amont du fleuve Bandama dont il est distant de 3 kilomètres, on y trouve un château d'eau et d'autres points d'eau à savoir des rivières et marigots (Barrage, Lahôbloua, N'Ziba, Do, etc.) auxquelles les populations ont recours pour leurs différentes activités. Sa population de 5585 habitants est composée d'autochtones Swamlin, d'allochtones Baoulé, Sénoufo, Dida, Wobé et d'allogènes Maliens, Burkinabé, Guinéens. Diverses activités agricoles y sont pratiquées (cultures de cacao, Tec, palmier à huile, hévéa). Le centre de santé rural dont il dispose accueille également des malades de l'UB.

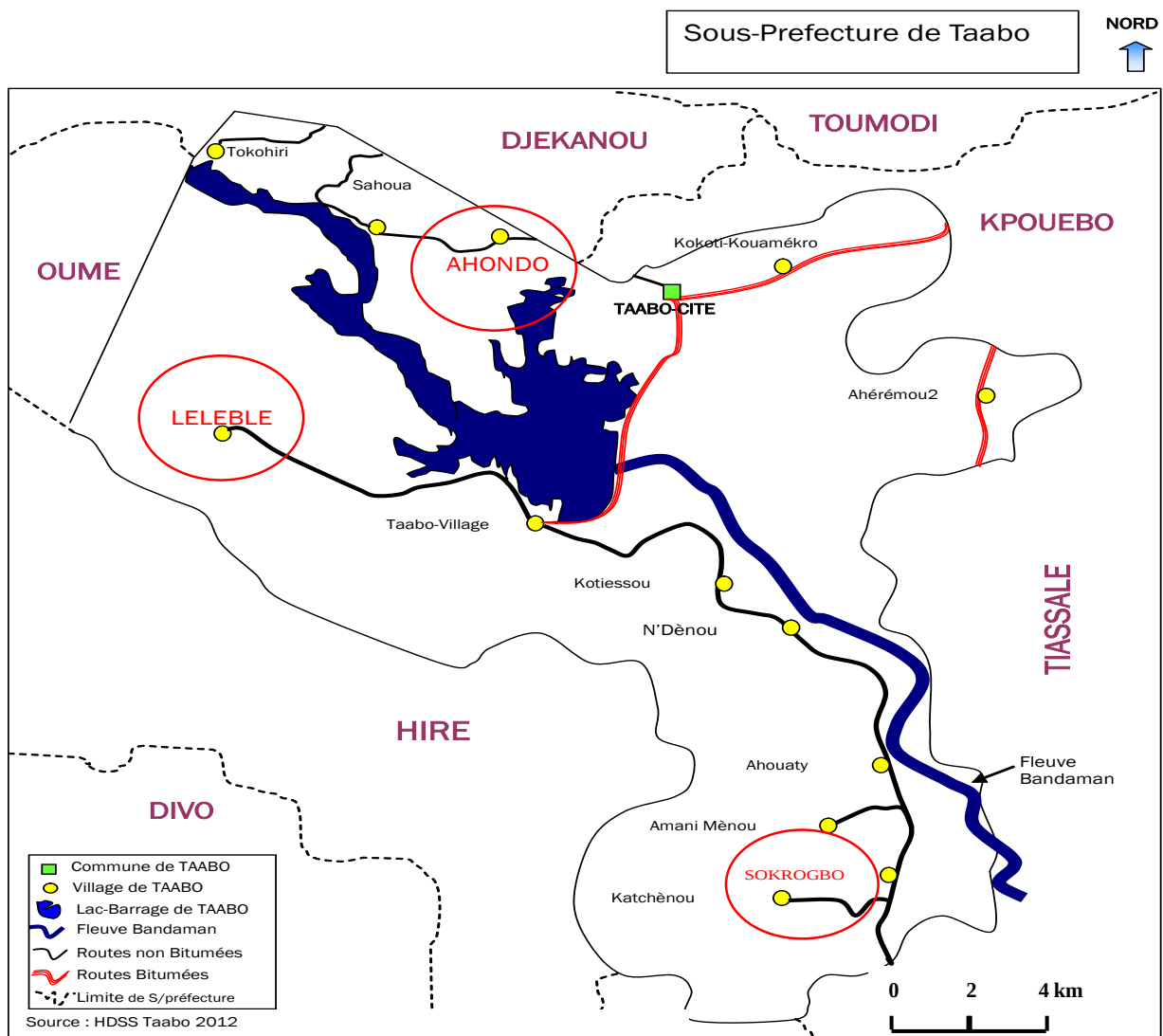


Figure 6 : Carte de la Sous-préfecture de Taabo

Source: (Taabo Health and Demographic Surveillance System, 2012)

○ Localité sélectionnée

Ahondo est un village localisé sur la rive droite du fleuve Bandama à 12 kilomètres de Taabo, en zone de forêt et de savane. Il dispose d'une pompe hydraulique et de quelques installations de la société de distribution d'eau en Côte d'Ivoire (SODECI) qui sont des sources d'eau potable. La majorité de la population a toutefois recours au fleuve Bandama, situé à 3 kilomètres du village, et d'autres points d'eau (Djapipo Barrage, etc.) pour les activités domestiques et socio-économiques. La population estimée à 2288 habitants se compose d'autochtones Swamlin, d'allochtones Baoulé, Attié, Yacouba, Sénoufo, Agni et d'allogènes Maliens, Guinéens, Burkinabés. L'activité de pêche est l'une des principales activités mais les cultures de café, cacao, hévéa, banane, aubergine, etc. y sont également pratiquées. Ahondo est doté d'un centre de santé qui prend en charge les cas d'UB

2.2.5. Questionnaire pour la détermination des points d'eau à échantillonner

La détermination des points d'eau échantillonnés (**Figure 7**) s'est effectuée à partir des résultats du questionnaire ménage (**Annexe 3**) administré aux populations dans le cadre du volet sociologique de l'étude sur 'la perception de l'UB et des risques de contamination'. Celui-ci a porté sur la transmission de l'UB, les modalités de traitement, les informations sur les sources d'approvisionnement en eau, les activités socio-économiques, etc. Ainsi, un total de 15 points d'eau les plus utilisés par les populations sont sélectionnés en vue de l'échantillonnage (**Tableau II**).

2.2.6. Collecte des échantillons

Trois types d'échantillons sont collectés à savoir des échantillons cliniques, environnementaux et animaux.

2.2.6.1. Echantillons cliniques

Pour la collecte des échantillons cliniques, une recherche des cas de personnes présentant des signes d'UB (nodule, œdème, ulcère) pris en charge par le centre de santé communautaire est réalisée. Des prélèvements sont réalisés par le personnel soignant de chaque centre de santé communautaire notamment, des prélèvements par aspirations à l'aide d'aiguille fine à partir des nodules et œdèmes, de même que des écouvillons à partir des ulcérations (**Figure 8**). Ces différents prélèvements sont transférés dans des tubes Eppendorf stériles de 2 mL hermétiquement fermés. Tous les échantillons sont conservés à froid dans une glacière contenant des packs de glace. L'historique clinique des patients est présenté dans les sections suivantes.



Figure 7 : Quelques points d'eau échantillonnés et utilisés par les communautés

A : Rivière La lobo, localité de Zaïbo, Département de Daloa

B : Etang Nidrou 1, localité de Gorodi, Département de Daloa

C : Etang Woudigné, localité de Sokrogbo, Département de Tiassalé

D : Etang Do, localité de Léléblé, Département de Tiassalé

E : Etang Djapipo Barrage, localité d'Ahondo, Département de Tiassalé

Tableau II : Points d'eau échantillonnés en fonction des départements et localités

Département	Localité	Point d'eau
Daloa	Zaïbo	Gbouwa Tourou La lobo
	Gorodi	Godo Nidrou 1 Nidrou 2
Tiassalé (Taabo)	Léléblé	Barrage Lahôbloua N'ziba Do
	Sokrogbo	Woudigné Barrage 1 Barrage 2
	Ahondo	Djapipo Barrage Bandama



Figure 8 : Prélèvements d'échantillons chez les cas d'infection cliniques

A : écouvillonnage d'une ulcération ; **B** : aspiration à l'aiguille fine d'un nodule.

Un total de 35 échantillons est obtenu auprès de 30 cas d'infection cliniques au sein des différentes localités notamment 33 écouvillons et 2 aspirations à l'aiguille fine (**Tableau III**).

Le département de Tiassalé (Taabo) représente la zone d'étude pour laquelle la majorité des prélèvements (28/35) ont été réalisés, avec les communautés d'Ahondo et Sokrogbo enregistrant 13 et 10 échantillons cliniques respectivement, contre 7 dans le département de Daloa.

2.2.6.2. Echantillons environnementaux

Concernant l'échantillonnage au niveau de l'environnement, la taille de l'échantillon a été définie à partir de la méthode de Williamson et collaborateurs (**Williamson et al., 2008**) avec cependant de légères modifications. En effet, selon cette méthode, le nombre d'échantillon d'un élément dans un quadrant de 1 m^2 est $n = 3$; pour chaque point d'eau la collecte des échantillons est également réalisée suivant les procédures décrites par le même auteur. Ainsi, à chaque point d'eau, quatre matrices (biofilms de plantes aquatiques, filtrats d'eau, détritiques de plantes, sols) sont recueillies. Les filtrats d'eau sont collectés en double exemplaire, les détritiques de plantes et les sols en triple exemplaire et les biofilms de plantes en cinq exemplaires, couvrant l'ensemble des plantes aquatiques dominantes.

Pour les biofilms (**Figure 9**), les tiges et les feuilles des plantes aquatiques dominantes sont coupées à l'aide d'une paire de ciseaux et mises dans un sac plastique Ziploc contenant 100 mL d'eau distillée stérile. Le sac est hermétiquement fermé et les biofilms sont délogés en secouant vigoureusement le sac à plusieurs reprises. Cinquante millilitres (50 mL) du mélange obtenu sont ensuite versés dans un tube Falcon de 50 mL.

Pour les filtrats d'eau (**Figure 9**), un bécher stérile est utilisé pour recueillir environ 2 L d'eau à la surface du point d'eau sur une superficie de 1 m^2 . Cinquante millilitres (50 mL) de cette eau sont versés dans une seringue de 50 mL munie d'un filtre en fibre de polyéthylène de $0,45 \mu\text{m}$ (Whatman Inc), tapissé d'un autre filtre de nitrocellulose de $0,45 \mu\text{m}$ (Whatman Inc). L'eau contenue dans la seringue est ensuite pompée au maximum à travers le filtre de nitrocellulose et celui-ci est retiré et complètement recouvert dans de l'aluminium.

Pour les détritiques des plantes, des feuilles et tiges mortes de plantes ainsi que des brins d'herbes provenant du point d'eau sont coupés en morceau d'environ 5 cm à l'aide d'une paire de ciseaux. Ces morceaux sont par la suite transférés dans un tube Falcon de 15 mL contenant 13 mL d'éthanol absolu.

Tableau III : Répartition des échantillons cliniques collectés au sein des communautés

Département	Localité	Cas cliniques	Type de prélèvement		
			Ecouvillon	Aspiration à l'aiguille fine	Total
Daloa	Zaïbo	3	3	0	3
	Gorodi	4	3	1	4
Tiassalé (Taabo)	Léléblé	4	5	0	5
	Sokrogbo	9	10	0	10
	Ahondo	10	12	1	13
Total		30	33	2	35



Figure 9 : Exemples de matrices environnementales collectées

A : filtrat d'eau sur filtre de nitrocellulose ; **B** : recueillement de biofilms de plantes ; **C** : sols préservés dans de l'éthanol absolu ; **D** : détritux de plantes préservés dans de l'alcool absolu.

Pour le sol, une lame de scalpel stérile (Carbon stell sterile surgical blades, Swann-Morton®) est utilisée afin de collecter environ 5 g de sol à raison d'un échantillon en bordure d'eau et deux échantillons à la zone riveraine de 5 m de distance. Les échantillons de sol sont conservés dans un tube Falcon de 15 mL contenant 10 mL d'éthanol absolu.

Toutes les matrices sont bien identifiées et conservées dans une glacière contenant des packs de glace. Les échantillons sont ensuite transportés au laboratoire et conservés à 4 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN total.

Entre chaque site de prélèvement, tout le matériel d'échantillonnage est lavé et décontaminé avec de l'eau de Javel à 10 % puis désinfecté avec de l'éthanol à 70 % ainsi qu'une solution éliminant toute trace d'ADN (DNA Away, Molecular BioProducts).

Au sein des différentes matrices environnementales prélevées à partir des points d'eau couramment utilisés par les populations, 195 échantillons sont obtenus à partir des 15 points d'eau à raison de 13 échantillons par point d'eau (**Tableau IV**).

2.2.6.3. Echantillons animaux

Avec l'expertise d'un écologiste des petits mammifères, les rongeurs sont piégés simultanément dans deux différents types d'habitats dans chaque localité à savoir, les points d'eau habituellement utilisés par les communautés et les habitations (**Figure 10**). Dans les deux types d'habitats, des techniques standardisées de piégeage direct sont utilisées pour capturer les animaux (**Rodgers et al., 2008**). Des pièges classiques Sherman (7,6 x 7,6 x 25,4 cm) sont mis en place au cours de deux nuits consécutives dans chaque type d'habitat. Un total de 100 pièges est installé par localité et par nuit de capture. Les pièges sont appâtés avec de la poudre de poisson mélangée à de la pâte d'arachide puis visités tôt le matin.

Tableau IV : Matrices environnementales collectées par point d'eau

Département	Localité	Points d'eau	Biofilms	Filtrats	Détritus	Sols	Total
Daloa	Zaïbo	Gbouwa	5	2	3	3	13
		Tourou	5	2	3	3	13
		La lobo	5	2	3	3	13
	Gorodi	Godo	5	2	3	3	13
		Nidrou 1	5	2	3	3	13
		Nidrou 2	5	2	3	3	13
Tiassalé (Taabo)	Léléblé	Barrage	5	2	3	3	13
		Lahôbloua	5	2	3	3	13
		N'ziba	5	2	3	3	13
		Do	5	2	3	3	13
	Sokrogbo	Woudigné	5	2	3	3	13
		Barrage 1	5	2	3	3	13
		Barrage 2	5	2	3	3	13
	Ahondo	Djapipo Barrage	5	2	3	3	13
		Bandama	5	2	3	3	13
Total			75	30	45	45	195



Figure 10 : Installation de pièges Sherman au sein des localités pour la capture des rongeurs
A : piège posé dans une habitation ; **B :** piège posé près d'un point d'eau ; **C :** spécimen de rongeur capturé présentant une lésion suspecte.

Après deux nuits successives de piégeage au sein de chaque localité, un total de 111 animaux sont capturés, soit un rendement de 11,5 % sur un nombre total de pièges de 969 (**Tableau V**).

L'enregistrement des pièges contenant des rongeurs est fait suivant leur emplacement dans la localité. Tous les pièges sont lavés avec de l'eau de Javel à la fin de chaque campagne de piégeage. Les animaux capturés sont placés individuellement dans un sac en tissu et examinés dans un 'petit' laboratoire de terrain installé à cet effet. Les autopsies sont réalisées après avoir euthanasié chaque animal, à l'aide d'un coton imbibé d'éther introduit directement dans le sac pendant 3 à 10 min, selon la taille de l'animal. Elles consistent à identifier les spécimens après avoir déterminé leur sexe, les avoir mesuré et pesés. Après cela, des lésions externes ressemblant à celles de l'UB (ulcérations ou nodules) sont recherchées sur la peau des animaux.

Comme réalisé pour les cas d'infection cliniques, en fonction de la nature des lésions retrouvées, des prélèvements par aspiration à l'aide d'aiguille fine, de même que des écouvillons et des biopsies sont recueillis et conservés dans des tubes Eppendorf stériles de 2 mL hermétiquement fermés. Après dissection, les organes tels que le cœur, le poumon, la rate, le rein, le foie, l'estomac, l'intestin grêle et le caecum sont prélevés. Il en va de même pour des prélèvements anaux. Les échantillons collectés sont étiquetés et conservés individuellement à - 20 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN total. Les carcasses des animaux sont conservées dans un récipient contenant de l'éthanol absolu pour d'éventuelles analyses.

Tableau V : Densité des petits mammifères capturés au sein des localités

Département	Localité	Effort de piégeage			Succès	Rendement (%)
		Nuit 1	Nuit 2	Total		
Daloa	Zaïbo	100	99	199	11	5,5
	Gorodi	100	90	190	34	17,9
Tiassalé (Taabo)	Léléblé	100	90	190	31	16,3
	Sokrogbo	100	100	200	14	7
	Ahondo	95	95	190	21	11,1
Total		495	474	969	111	11,5

2.2.7. Préparation des échantillons et analyse de laboratoire

2.2.7.1. Préparation des échantillons

Tous les échantillons sont traités au préalable avant leur analyse au laboratoire de biologie moléculaire du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS).

Biofilms des plantes aquatiques

Les suspensions de biofilms initialement obtenues sont concentrées sur la base d'un protocole optimisé développé au laboratoire. Cinquante millilitres de suspension de biofilms contenus dans chaque tube sont homogénéisés brièvement à l'aide d'un vortex (FB 15012 TopMix, Fischer Scientific) et répartis dans 3 tubes Falcon de 15 mL puis centrifugés à 4 x 1000 g pendant 20 min à l'aide d'une centrifugeuse (Labofuge 200, Heraeus SEPATECH). Environ 6 mL de surnageant sont retirés délicatement, puis le reste de la suspension centrifugé à 4 x 1000 g pendant 20 min à température ambiante. A nouveau, 4 mL de surnageant sont retirés comme précédemment et le reste de la suspension de nouveau centrifugé à 4 x 1000 g pendant 20 min à température ambiante.

Après cette dernière centrifugation, 2 mL de surnageant sont retirés. Les culots restants de 3 mL chacun, obtenus pour chaque tube Falcon de 15 mL, sont alors regroupés dans un même tube et la suspension concentrée de biofilms est conservée à 4 °C. Pour l'extraction de l'ADN, 1000 µL de la suspension concentrée de biofilms, transférés dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL, sont centrifugés à 13300 g pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse (AccuSpin Micro 17 R, Fisher Scientific). Après avoir retiré 700 µL de surnageant, 300 µL du culot restant sont utilisés pour l'extraction de l'ADN.

Filtrats d'eau

Les filtres de nitrocellulose contenant chacun un filtrat d'eau sont retirés des papiers aluminium les recouvrant, puis découpés en morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux. Les morceaux obtenus sont alors transférés dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL pour l'extraction de l'ADN.

Détritus de plantes

Un morceau d'environ 700 mg de chaque détrit, coupé à l'aide d'une paire de ciseaux, est transféré dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL auquel 400 µL d'éthanol absolu sont ajoutés. Le tube est centrifugé à 13300 g pendant 5 min puis 300 µL d'éthanol sont retirés et le morceau de détrit est utilisé pour l'extraction de l'ADN.

Sols

Chacun des échantillons de sol, conservé dans de l'éthanol absolu dans un tube Falcon de 15 mL, est vigoureusement secoué puis 500 µL du mélange sont transférés dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL. Le tube est ensuite centrifugé à 13300 g pendant 5 min et tout le surnageant retiré et rejeté. Le culot de sol obtenu est utilisé pour l'extraction de l'ADN.

Écouvillons, aspirations à l'aiguille fine, biopsies

Pour chaque suspension obtenue par l'aspiration à l'aide d'aiguille fine à partir de nodule ou d'œdème, 2 mL de tampon PBS 1X sont ajoutés à 300 µL de suspension contenue dans un tube Eppendorf de 1,5 mL stérile.

Pour les écouvillons d'ulcérations et les biopsies, 2 mL de tampon PBS 1X sont ajoutés au tube de 2 mL contenant l'écouvillon ou la biopsie. Le tube est secoué vigoureusement à l'aide d'un vortex pendant 5 min afin de recueillir les cellules bactériennes.

Pour les organes (cas des échantillons animaux), une pièce d'organe est découpée à l'aide d'un scalpel (Carbon stell sterile surgical blades, Swann-Morton®) puis redécoupé en plus petits morceaux afin de permettre une bonne macération des tissus. Le tout est introduit dans un tube stérile de 1,5 mL auquel 300 µL de tampon PBS 1X sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé vigoureusement à l'aide d'un vortex.

Pour chaque type d'échantillon, 1 mL de la suspension précédemment obtenue (l'autre moitié étant conservée à 4 °C pour une utilisation ultérieure) est transféré dans un nouveau tube Eppendorf stérile de 1,5 mL. La suspension est brièvement remuée au vortex puis centrifugée à 13300 g pendant 5 min. Huit cents microlitres de surnageant sont retirés et 200 µL du culot cellulaire restant sont utilisés pour l'extraction de l'ADN.

2.2.7.2. Coloration au Ziehl-Neelsen des bacilles acido-alcool résistants

La coloration des bacilles acido-alcool résistants (BAAR) est réalisée selon la méthode décrite par Yeboah-Manu (**Yeboah-Manu *et al.*, 2004**) avec de légères modifications à l'aide d'un kit de coloration (Laboratorios Conda, SA pronadisa). Environ deux gouttes de suspension bactérienne, obtenue après préparation des échantillons, sont étalées sur une lame porte-objet (MENZEL-GLÄZER 76 x 26 mm, Thermo Scientific); la lame est passée lentement sur une flamme jusqu'à la fixation du frottis. Elle est ensuite inondée de fuchsine phéniquée (Laboratorios Conda, SA pronadisa) et laissée pendant 5 min avant d'être rincée avec de l'eau distillée et décolorée avec un mélange d'alcool et d'acide chlorhydrique (3 %) (Laboratorios Conda, SA

pronadisa). La préparation est alors inondée de bleu de méthylène (Laboratorios Conda, SA pronadisa) pendant 2 min puis rincée complètement avec de l'eau distillée et séchée à l'air ambiant.

Cette préparation obtenue est observée en immersion dans l'huile au microscope optique (LEICA DM 500, Leica) au grossissement x100. Une photographie est prise en cas d'observation de BARR.

2.2.7.3. Extraction de l'ADN

Pour chaque extraction, des contrôles négatifs (eau distillée stérile) et positifs (souche positive de *M. ulcerans* 1615) sont utilisés.

L'extraction de l'ADN à partir des échantillons cliniques est réalisée en utilisant le kit d'extraction QIAGEN Dneasy blood and tissue kit et en suivant le protocole du fabricant. En effet, 500 µL de la suspension obtenue après préparation des échantillons sont transférés dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL. Après centrifugation à 13300 g pendant 10 min, 300 µL du surnageant sont retirés. Cent quatre-vingt microlitres (180 µL) de tampon ATL et 20 µL de protéinase K sont alors ajoutés au culot de cellules bactériennes restant. Le mélange est brièvement remué au vortex et incubé à 56 °C pendant 3 h ; il est également remué au vortex par intervalle d'une heure.

Après incubation, 200 µL de tampon AL sont ajoutés, puis le mélange brièvement remué au vortex est incubé à 70 °C pendant 30 min. Après cela, 250 µL d'éthanol absolu sont ajoutés et le mélange est de nouveau remué au vortex puis transféré sur une colonne filtrante (QIAGEN DNeasy spin column).

Après centrifugation à 8000 g pendant 1 min, le liquide écoulé dans le tube porte colonne est rejeté. L'ADN fixé à la colonne est alors lavé par ajout de 500 µL de tampon AW1, suivi d'une centrifugation à 8000 g pendant 1 min. Le liquide écoulé est rejeté et l'étape de lavage est répétée par ajout de 500 µL de tampon AW2, puis la colonne est de nouveau centrifugée à 13300 g pendant 3 min pour éliminer le reste du tampon AW2. La colonne est transférée dans un nouveau tube stérile de 1,5 mL et 150 µL de tampon AE sont déposés sur la colonne.

Après une incubation pendant 2 min à température ambiante suivie d'une centrifugation à 8000 g pendant 1 min, l'ADN est enfin élué. La solution d'ADN génomique ainsi obtenue est conservée à - 20 °C jusqu'à utilisation ultérieure pour l'amplification.

L'extraction de l'ADN à partir des échantillons environnements et animaux est réalisée selon le protocole décrit par Williamson (**Williamson *et al.*, 2008**) avec de légères modifications.

A chaque échantillon préalablement préparé et contenu dans un tube stérile de 1,5 mL, 450 µL de tampon de lyse sont ajoutés. Environ 1 g de billes de verre (Disruption Beads, Glass, 0,1 mm for

bacteria, Research Products International Corp, rpI) est ajouté et le mélange est vigoureusement homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 10 min afin de casser les cellules bactériennes. Une incubation à 65 °C dans un bain sec chauffant pendant 20 min est réalisée, suivie d'une centrifugation à 5600 g pendant 2 min. Quatre cents microlitres (400 µL) du surnageant obtenu sont transférés dans un nouveau tube Eppendorf stérile de 1,5 mL.

Après cela, 150 µL de tampon de neutralisation sont ajoutés et le mélange est incubé à - 20 °C toute une nuit. Après incubation, une nouvelle centrifugation à 5600 g pendant 30 min est effectuée et 400 µL du surnageant sont transférés dans un nouveau tube stérile de 1,5 mL auxquels 600 µL de tampon de fixation sont ajoutés. Le mélange est brièvement remué au vortex puis 700 µL sont transférés sur une colonne filtrante (MOBIO spin column or Zymo-Spin^{II} column), adaptée un tube stérile de 1,5 mL. Le tout est centrifugé à 5600 g pendant 2 min. Le liquide écoulé est rejeté et l'ADN contenu dans la colonne est lavé en ajoutant 500 µL de tampon de lavage 1.

Après centrifugation à 5600 g pendant 2 min, le liquide écoulé est rejeté et l'étape de lavage est répétée avec 500 µL de tampon de lavage 2. Une centrifugation à 5600 g pendant 5 min est à nouveau effectuée pour éliminer le reste du tampon de lavage 2. La colonne filtrante est transférée dans un nouveau tube stérile de 1,5 mL et 150 µL de tampon d'élution y sont ajoutés.

Après une incubation pendant 5 min à température ambiante suivie d'une centrifugation à 5600 g pendant 2 min, l'ADN est enfin élué. La solution d'ADN génomique obtenue est conservée à - 20 °C jusqu'à utilisation ultérieure pour l'amplification.

2.2.7.4. Amplification des gènes d'intérêt par réaction de polymérisation en chaîne

Pour chaque amplification, des témoins négatifs (eau stérile) et positifs (souche positive de MNT notamment *M. ulcerans* 1615, *M. marinum* DL 240490, *M. marinum* BB) sont inclus. Des contrôles spécifiques de l'inhibition de l'amplification, due à la présence d'enzymes, observée pour les échantillons environnementaux sont également utilisés. Ils se composent d'un mélange de contrôle positif et d'un échantillon environnemental.

De plus, pour toutes les amplifications avec les échantillons environnementaux, une solution de BSA (Thermo Scientific) est ajoutée afin de réduire cette inhibition. Un thermocycleur programmable (A200 Gradient Thermal cycler, LongGene[®]) paramétré avec les différents programmes d'amplification (**Tableau VI**) selon le gène d'intérêt est utilisé pour chaque réaction d'amplification.

Tableau VI : Programmes d'amplification des gènes d'intérêt

Gènes d'intérêt	Dénaturation initiale		Nombre de cycles	Dénaturation		Hybridation		Elongation		Extension finale	
	T° (°C)	Temps (min)		T° (°C)	Temps (sec/min)	T° (°C)	Temps (sec/min)	T° (°C)	Temps (sec/min)	T° (°C)	Temps (sec/min)
16S rRNA	95	3	35	95	*45	56	*45	72	*45	72	10
IS2404 (réaction 1)	95	2	40	94	*30	66	*45	72	1	72	10
IS2404 (réaction 2)	95	2	35	94	*30	67,7	*45	72	*45	72	10
ER	95	2	40	94	1	62,5	1	72	1	72	10
Locus 6 Locus 19 MIRU1	95	2	40	94	1	58,5	1	72	1	72	10
ST 1	95	2	40	94	1	63,1	1	72	1	72	10

T° : température ; **min** : minutes ; **sec** : secondes ; * temps en secondes

Détection de la séquence d'insertion IS2404

L'amplification de la séquence d'insertion IS2404 est réalisée par PCR nichée (nested PCR), adaptée du protocole de Ablordey (**Ablordey *et al.*, 2012**).

La première réaction est effectuée pour chaque échantillon d'ADN testé, dans un tube PCR stérile de 0,2 mL (ABgene) contenant un mélange réactionnel de 25 µL comprenant du tampon PCR 1X (Thermo Scientific), 2 mM de MgCl₂ contenu dans le tampon PCR, 300 µM de chaque désoxyribonucléotide (Thermo Scientific), 700 nM de chaque amorce pGp1 et pGp2 (Inqaba Biotech), 1U de Taq Polymérase (Thermo Scientific) et 5 µL d'ADN génomique extrait. Les produits d'amplification sont conservés à 4 °C à la fin de la réaction d'amplification.

Dans la seconde réaction, 1 µL du produit d'amplification obtenue après la première réaction est utilisé comme échantillon d'ADN dans un mélange réactionnel de 25 µL. Ce mélange contient les mêmes concentrations de réactifs utilisées lors la première réaction à l'exception des amorces pGp3 et pGp4 utilisées chacune à la concentration de 500 nM. Les produits d'amplification sont conservés à 4 °C à la fin de la réaction d'amplification.

Amplification des gènes 16S rRNA (ARNr 16S) et ER

Les gènes 16S rRNA et ER sont amplifiés séparément comme décrit par Williamson (**Williamson *et al.*, 2008**), en utilisant les mêmes concentrations de réactifs précédemment décrites.

Le mélange réactionnel est préparé dans un volume de 25 µL contenant du tampon PCR 1X (Thermo Scientific), 2 mM de MgCl₂ contenu dans le tampon PCR, 400 µM de chaque désoxyribonucléotide (Thermo Scientific), 160 nM de chaque amorce sens et anti sens (Inqaba Biotech), 1U de Taq polymérase (Thermo Scientific) et 5 µL d'ADN génomique extrait. Pour les échantillons environnementaux, 200 ng/µL de BSA sont ajoutés afin de réduire l'inhibition. Les produits d'amplification sont conservés à 4 °C à la fin de la réaction d'amplification.

Amplification des loci VNTR

L'amplification des loci VNTR est adaptée de protocoles déjà décrits (**Hilty *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2012**). Quatre loci à savoir locus 6, locus 19, MIRU1 (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units), ST1 (Sequence Type 1) sont amplifiés séparément mais en utilisant les mêmes concentrations décrites ci-dessus pour l'amplification des gènes ER et 16S rRNA. Les produits d'amplification sont conservés à 4 °C à la fin de la réaction d'amplification.

2.2.7.5. Electrophorèse des produits d'amplification et visualisation sous ultra-violets

Après l'amplification, 5 µL de produit d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (Thermo Scientific) à 1 %, contenant du BET (amReSCO), en présence d'un tampon de migration (10X TBE Electrophoresis Buffer, Thermo Scientific) à 0,5X. La migration des produits amplifiés est effectuée pendant 40 min à 85 volts à l'aide d'un générateur (APELEX PS 608). Le gel est ensuite visualisé sous ultra-violets à l'aide d'un transilluminateur (Benchtop 2UV™ Transilluminator UVP).

Pour chaque électrophorèse réalisée, un marqueur de taille contenant des fragments d'ADN de 100 pb (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder) est également utilisé. L'image du gel est prise grâce à une caméra (BioDoc-It™ Imaging System) et la taille des produits d'amplification est confirmée suivant l'échelle du marqueur de taille.

2.2.7.6. Analyse des produits VNTR et désignation des profils

Les nombres de séquences nucléotidiques répétées des loci VNTR sont calculés sur la base de données publiées (Ablordey *et al.*, 2005a; Stragier *et al.*, 2005; Hilty *et al.*, 2006; Hilty *et al.*, 2007; Lavender *et al.*, 2008; Williamson *et al.*, 2008). Le Tableau VII montre la taille des produits de PCR et le nombre de répétitions correspondantes pour chaque locus VNTR.

2.2.8. Séquençage

Les produits d'amplification présentant une taille correspondante à celle attendue, sont ré-amplifiés (40 µL) et envoyés pour le séquençage (Macrogen Inc, Pays-Bas). Les amorces sens de tous les gènes sont utilisées pour le séquençage. Les séquences sont alignées en utilisant un programme d'alignement local de séquences (BLAST, NCBI) (Altschul *et al.*, 1990).

Tableau VII : Taille des produits d’amplification et nombre de répétition associé

Loci VNTR	Taille de séquence (en pb)	Taille du produit d’amplification (en pb) (nombre de répétition associé)				
MIRU 1	53	404 (1)	457 (2)	510 (3)	563 (4)	616 (5)
Locus 6	56	454 (1)	510 (2)	566 (3)	622 (4)	678 (5)
ST1	54	369 (1)	423 (2)	477 (3)	531 (4)	585 (5)
Locus 19	56	288 (1)	344 (2)	400 (3)	456 (4)	512 (5)

2.2.9. Analyse statistique des données

Pour ce qui est de l'analyse des données, l'élaboration de la carte des sites d'étude est réalisée à l'aide de l'outil Arc GIS. De plus, les données sont entrées sur Microsoft Excel pour l'élaboration des graphiques.

Par ailleurs, les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel STATA version 12.0. Les différentes distributions des MNT en fonction des matrices, des points d'eau et des localités sont analysées par le Test de Pearson avec une significativité à 95 %, $p\text{-value} < 0,05$.

III - RESULTATS

Les résultats présentés ci-après sont regroupés suivant les objectifs spécifiques énoncés précédemment.

En ce qui concerne la microbiologie, l'identification des mycobactéries par coloration au Ziehl-Neelsen n'a donné aucune observation spécifique des BARR pour chaque type d'échantillons testé.

3.1. Distribution de *Mycobacterium ulcerans* au sein des communautés

La mesure de la distribution de *M. ulcerans* au sein des populations est réalisée à partir de la confirmation des cas cliniques d'infection chez les patients rencontrés dans les centres de santé des communautés.

3.1.1. Confirmation des cas d'infection cliniques au sein des communautés

Sur les 30 cas d'infection cliniques retenus, une répartition homogène est observée entre les patients de sexe masculin et féminin à raison de 15 cas masculins (50 %) et 15 cas féminins (50 %). L'âge des sujets varie entre 6 et 70 ans avec 9 cas (30 %) de moins de 18 ans. La majorité des lésions (94,3 %) sont des ulcérations. Les données cliniques relatives aux cas d'infection sont reportées ci-après (**Tableau VIII**).

Sur l'ensemble des échantillons cliniques testés, la séquence d'insertion IS2404 est détectée dans 33 fragments d'ADN représentant 94,3 % des cas. Par ailleurs, l'amplification du gène ER, codant pour l'enzyme impliquée dans la synthèse de la mycolactone, a permis d'identifier seulement 6 échantillons positifs soit 17,1 % des cas (**Figure 11** et **Figure 12**).

Tableau VIII : Données cliniques sur les cas d'infection au sein des communautés

Département	Localité	Code échantillon	Données cas d'infection				Tests moléculaires	
			Sexe	Age (ans)	Lésion	Type d'échantillon	IS2404	ER
Daloa	Zaïbo	SZ1	M	27	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SZ2	F	65	ulcère	écouvillon	Neg	Neg
		SZ3	F	27	ulcère	écouvillon	Neg	Neg
	Gorodi	FG1	M	21	nodule	aspiration aiguille fine	Pos	Neg
		SG2	F	29	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SG3	F	70	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SG4	F	48	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
Tiassalé (Taabo)	Léléblé	SL1	M	7	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SL2	M	7	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SL3	F	43	ulcère	écouvillon	Pos	Pos
		SL4a	M	10	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SL4b	M	10	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
	Sokrogbo	SS1	M	60	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS2	F	10	ulcère	écouvillon	Pos	Pos
		SS3	F	56	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS4	F	19	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS5	F	30	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS6a	M	17	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS6b	M	17	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS7	F	20	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS8	F	30	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SS9	M	36	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
	Ahondo	SA1	M	12	ulcère	écouvillon	Pos	Pos
		SA2	M	50	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SA3a	M	25	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SA3b	M	25	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		FA4	M	49	nodule	aspiration aiguille fine	Pos	Neg
		SA6	F	13	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SA7	F	18	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SA8	M	44	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SA9	F	6	ulcère	écouvillon	Pos	Pos
		SA10	M	12	ulcère	écouvillon	Pos	Pos
		SA11	M	10	ulcère	écouvillon	Pos	Pos
		SA12a	M	44	ulcère	écouvillon	Pos	Neg
		SA12b	M	44	ulcère	écouvillon	Pos	Neg

M : masculin, **F** : féminin, **Pos** : échantillon testé positif, **Neg** : échantillon testé négatif

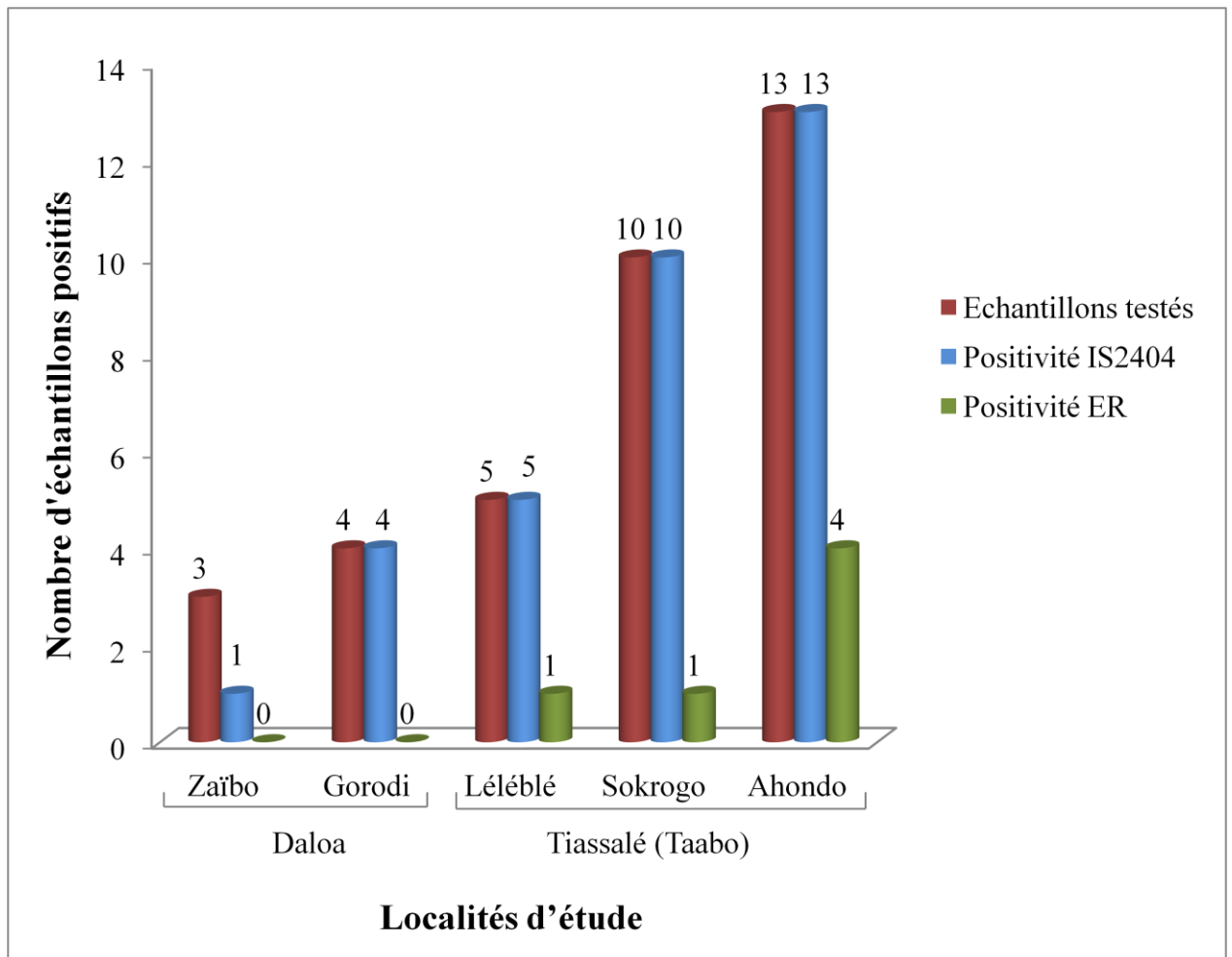


Figure 11 : Séquence d'insertion IS2404 et gène ER dans les fragments d'ADN des échantillons prélevés des cas d'infection cliniques

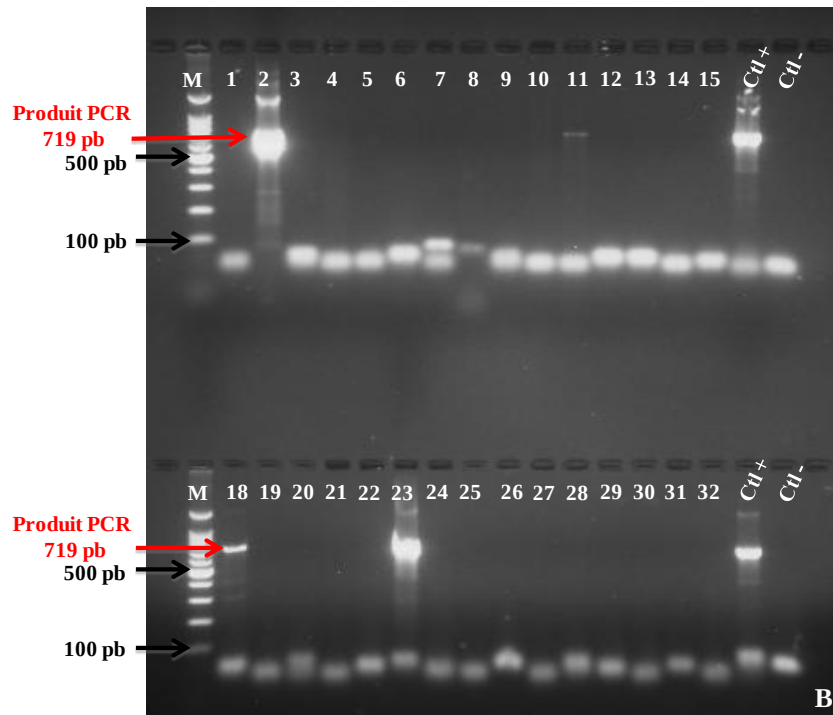
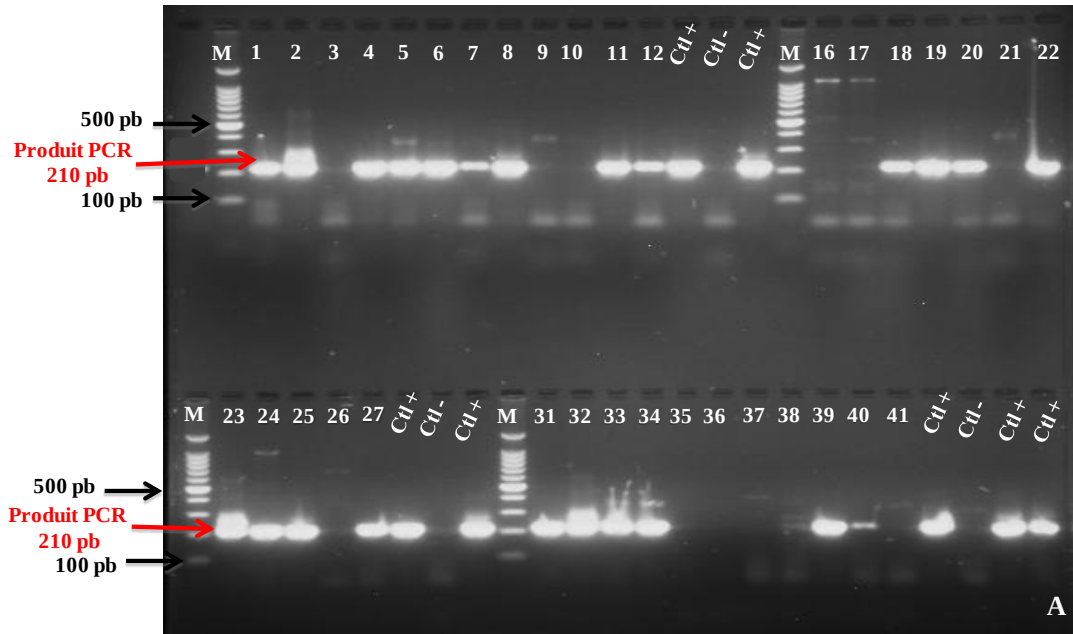


Figure 12 : Amplification des gènes d'intérêt des fragments d'ADN des échantillons des cas d'infection cliniques

A : amplification IS2404 ; **B** : amplification ER.

M : marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (100 pb pour chaque intervalle) ; **lignes 13, 15, 28, 30, 42, 44, 45 (A) / 16, 33 (B)** : Ctl+, contrôle positif (souche positive de *M. ulcerans*) ; **lignes 14, 29, 43 (A) / 17, 34 (B)** : Ctl-, contrôle négatif (eau stérile) ; lignes 1-41: échantillons cliniques testés.

3.1.2. Discrimination des isolats de *Mycobacterium ulcerans* identifiés et géotypage

La discrimination des échantillons par typage des loci VNTR a révélé la taille des produits d'amplification (**Figure 13**). Chaque taille de produit d'amplification obtenu correspond à un nombre de copies défini.

Ainsi, le profil allélique VNTR est établi selon le nombre de copies obtenues respectivement pour MIRU1, locus 6, ST1 et locus 19. L'amplification des loci VNTR a permis d'obtenir un profil allélique pour sept des échantillons testés ; ceux-ci étant issus des trois localités du département de Tiassalé (Taabo) (**Tableau IX**).

Cinq géotypes sont établis suivant les profils observés pour les loci testés. L'absence d'amplification étant indiquée par le symbole ' _ ' au niveau du profil désigné. Les 2 principaux géotypes sont Q (3, 1, 2, 2) et R (4, _ , 2 ,2) résultant de l'amplification d'au moins 3 loci. Les géotypes S (1, 1, _ , _), T (9, 1, _ , _) et U (_ , 1, _ , 4) sont établis suivant l'amplification de seulement deux loci.

Un monomorphisme est observé pour le locus 6 et ST1 avec les mêmes nombres de répétitions de 1 et 2 respectivement suivant les échantillons pour lesquels ils sont amplifiés (locus 6 : SL2, SS1 SA2, SA9 et SA10 ; ST1 : SL3, SS2 et SA10). Par contre, un polymorphisme est observé pour les deux autres loci qui présentent des nombres de répétitions différents de 1, 3, 4 et 9 pour MIRU1 ; 2 et 4 pour le locus 19.

Suivant les géotypes établis pour cette étude, le géotype Q est commun aux communautés de Léléblé et Ahondo. Dans le département de Tiassalé, au sein de chaque localité, deux géotypes différents sont retrouvés à savoir les géotypes Q et S pour Léléblé ; T et R pour Sokrogbo ; Q et U pour Ahondo.

Au regard de l'ensemble des profils moléculaires obtenus, une diversité génétique caractérise les isolats issus des échantillons cliniques au sein des localités du département de Tiassalé (Taabo) (**Tableau IX**).

Cependant, au niveau des deux localités du département de Daloa (Zaïbo et Gorodi), aucun géotype n'est établi. En effet, en l'absence d'amplification de tous les loci VNTR utilisés pour les échantillons testés issus de ces localités, l'obtention de profils VNTR complets n'a pu se faire.

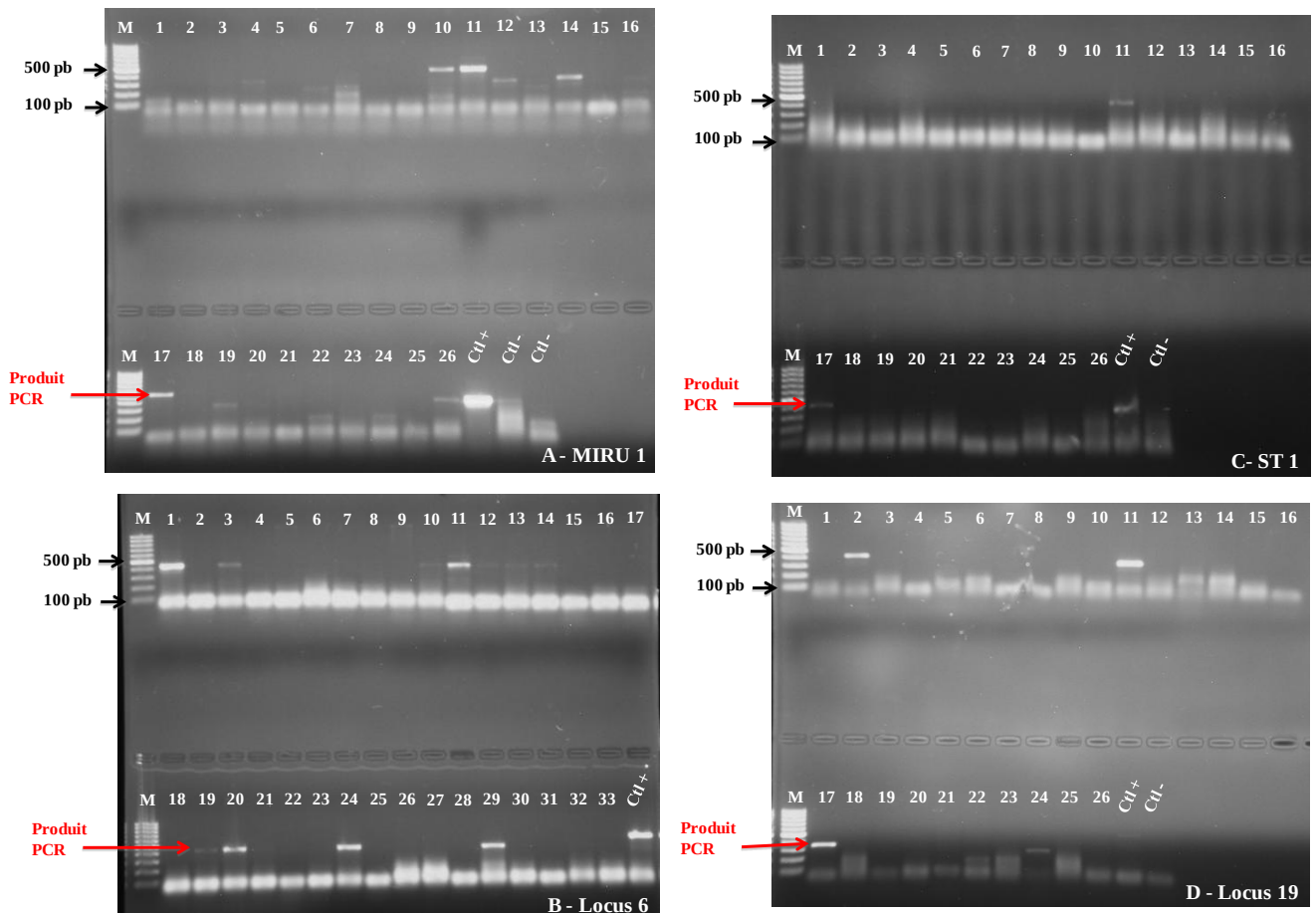


Figure 13 : Amplification des loci VNTR des fragments d'ADN des échantillons prélevés des cas confirmés

A : amplification de MIRU1 ; **B :** amplification de locus 6 ; **C :** amplification de ST1 ; **D :** amplification de locus 19.

M: marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (100 pb pour chaque intervalle) ; **lignes 27, 34 :** Ctl+, contrôle positif (souche positive de *M. Marinum*) ; **lignes 28, 29 :** Ctl-, contrôle négatif (eau stérile) ; **lignes 1-26 (A/C/D) et 1-33 (B) :** échantillons cliniques testés.

Tableau IX : Profil VNTR et génotypes des isolats issus des cas d'infection cliniques

Département Tiassalé (Taabo)		Tests moléculaires						
		Détection gène		Profil loci VNTR				Génotype
Localité	Code échantillon	IS2404	ER	MIRU1	Locus 6	ST1	Locus 19	
Léléblé	SL2	Pos	Neg	1	1	0	0	S __
	SL3	Pos	Pos	3	0	2	2	Q _
Sokrogbo	SS1	Pos	Neg	9	1	0	0	T __
	SS2	Pos	Pos	4	0	2	2	R _
Ahondo	SA2	Pos	Neg	0	1	0	4	U __
	SA9	Pos	Pos	3	1	0	0	Q __
	SA10	Pos	Pos	3	1	2	2	Q

Pos : échantillon testé positif ; **Neg** : échantillon testé négatif ; **0** : locus non amplifié ; **Q _**, **R _** : génotype avec un locus non amplifié ; **S _ _**, **T _ _**, **U _ _**, **Q _ _** : génotype avec deux loci non amplifiés ; **SL** : écouvillon Léléblé ; **SS** : écouvillon Sokrogbo ; **SA** : écouvillon Ahondo.

3.2. Environnements comme potentiels réservoirs de mycobactéries non tuberculeuses

L'identification des environnements contaminés par les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) notamment *M. ulcerans*, ainsi que les potentiels réservoirs avec lesquels les communautés sont en contact, est réalisée à partir des échantillons environnementaux et animaux collectés.

3.2.1. Identification des environnements aquatiques contaminés

3.2.1.1. Distribution des mycobactéries non tuberculeuses au sein des environnements aquatiques des localités

La présence de ces mycobactéries au niveau des points d'eau est mise en évidence par l'amplification du gène 16S rRNA et la détection de la séquence d'insertion IS2404 (**Figure 14**).

Sur les 15 points d'eau échantillonnés, seul le point d'eau Djapipo Barrage se trouvant dans la localité d'Ahondo (Département de Tiassalé) n'est pas contaminé par les mycobactéries. Pour les 14 autres points d'eau, la présence des MNT est détectée à travers les différentes matrices. Le point d'eau Tourou dans la localité de Zaïbo (Département de Daloa) présente le plus grand nombre d'échantillons contaminés par ces mycobactéries avec une positivité pour l'ensemble des matrices testées (**Figure 14**). Au total, 103/195 échantillons sont positifs après l'amplification du gène 16S rRNA soit 52,8 % de taux de positivité.

La détection de la séquence IS2404 sur ce lot d'échantillons positifs (103) a permis d'identifier 17 matrices contaminées par les MNT et arborant cette séquence d'insertion soit un taux de positivité de 8,7 % sur l'ensemble des 195 échantillons. Le point d'eau Gbouwa dans la localité de Zaïbo (Département de Daloa) présente le plus grand nombre de matrices contaminées (4/17) à savoir 1 biofilm de plantes, 2 filtrats d'eau et 1 détritrus de plantes. Par contre pour les points d'eau Nidrou 1 (Gorodi), Do (Léléblé), Barrage 1 et 2 (Sokrogbo), aucune MNT n'est détectée après amplification de la séquence d'insertion IS2404 (**Figure 14**).

Par ailleurs, concernant les matrices environnementales analysées, de manière générale, les filtrats d'eau et les biofilms de plantes aquatiques sont celles renfermant le plus grand nombre de mycobactéries plus particulièrement les MNT (positivité IS2404 observée) (**Figure 15**).

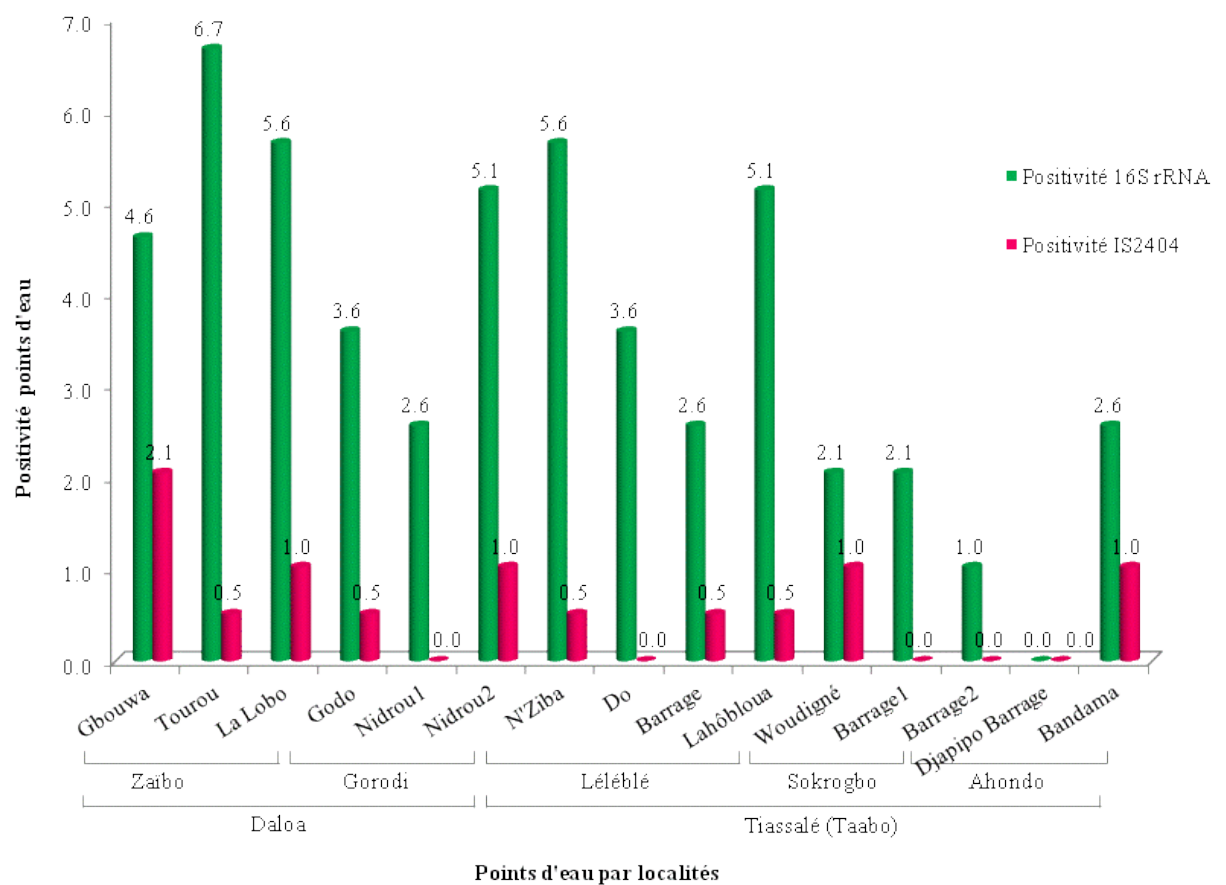


Figure 14 : Détection des mycobactéries non tuberculeuses au niveau des points d'eau

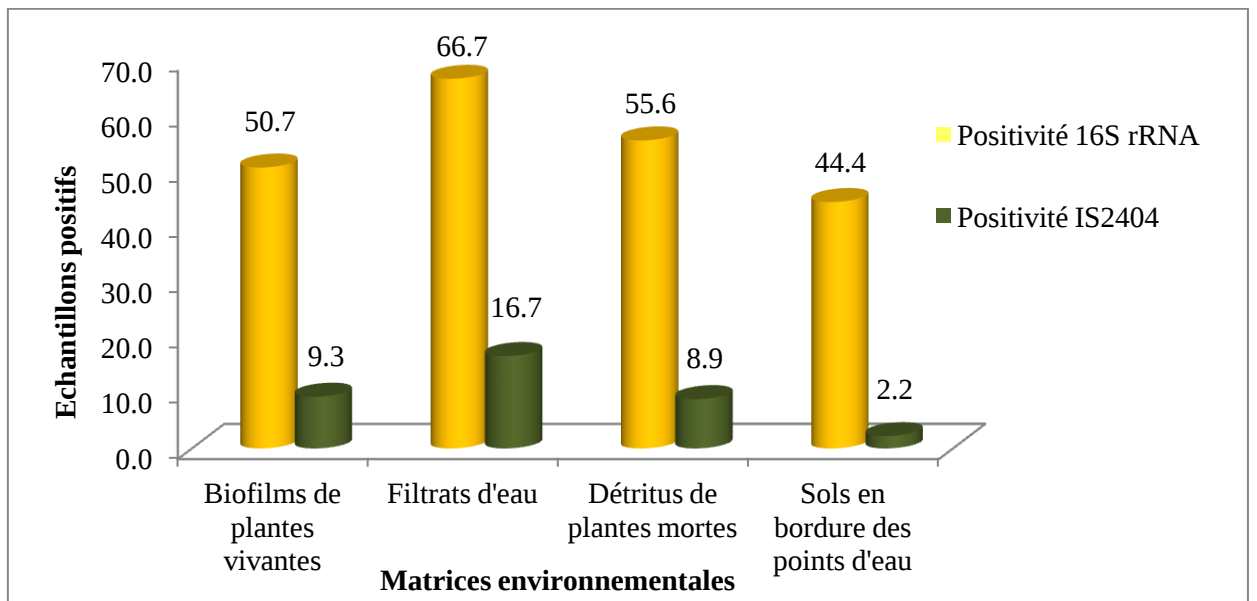


Figure 15 : Distribution des mycobactéries au sein des matrices environnementales

L'amplification du gène 16S rRNA a permis d'évaluer le taux de positivité au sein de chaque type de matrices. Il est respectivement de 50,7 %, 66,7 %, 55,6 % et 44,4 % pour les biofilms, les filtrats d'eau, les détritiques et les sols. Après détection de la séquence IS2404, le taux de positivité selon le type de matrices est respectivement de 9,3 %, 16,7 %, 8,9 % et 2,2 % pour les biofilms, les filtrats, les détritiques et les sols (**Tableau X**).

Après comparaison de ces taux de positivité observés entre eux, on note qu'aucun type de matrices utilisées ne montre une sensibilité spécifique quant à la contamination par les MNT quelque soit le marqueur amplifié. Test de Pearson $P = 3,84$; $p\text{-value} = 0,278$ et $P = 4,81$; $p\text{-value} = 0,187$ respectivement pour 16S rRNA et IS2404 (**Tableau X**).

Après amplification du gène 16S rRNA, les localités ayant le plus grand nombre de matrices contaminées par les mycobactéries (*Mycobacterium spp*) sont celles de Zaïbo avec 33/39 échantillons soit 84,6 %, Léléblé 33/52 soit 63,5 % et Gorodi 22/39 soit 56,4 %.

Le taux de positivité le plus faible est observé pour les localités de Sokrogbo avec 10/39 échantillons soit 25,6 % et Ahondo 5/26 soit 19,2 % (**Figure 16**).

Avec la détection de la séquence IS2404, la localité de Zaïbo présente également le plus grand taux de positivité pour les MNT avec 7/39 échantillons soit 17,9 %. La localité de Sokrogbo avec 2/39 échantillons soit 5,1 % est celle ayant le plus faible taux de positivité (**Figure 16**).

Dans l'ensemble, les cinq localités présentent des distributions différentes. Cependant, le Test de Pearson a montré que les localités de Sokrogbo et Ahondo d'une part ($p\text{-value} = 0,54$) et de Gorodi et Léléblé d'autre part ($p\text{-value} = 0,5$), ont un taux de positivité statistiquement égal.

3.2.1.2. Distribution des mycobactéries productrices de mycolactone

L'amplification du gène ER codant pour les mycobactéries productrices de mycolactone (MPM) n'a permis de détecter aucune mycobactérie au niveau des matrices précédemment identifiées comme renfermant des MNT. De plus, certains des 4 loci VNTR n'ont pu être amplifiés à partir des échantillons identifiés positifs pour les MNT. Ceci n'a donc pas rendu possible la discrimination des isolats de MNT par typage VNTR comme procédé avec les échantillons issus des cas d'infection cliniques.

Cependant, après séquençage des matrices testées positives pour les MNT, l'identification précise des MNT impliquées dans les contaminations des points d'eau au sein des localités a été réalisée.

Tableau X : Proportion des échantillons testés positifs en fonction des matrices environnementales

Matrices	N	16S rRNA (%)*	IS2404 (%)**
Biofilms	75	50,7	9,3
Filtrats	30	66,7	16,7
Détritus	45	55,6	8,9
Sols	45	44,4	2,2

*Test de Pearson Chi2 P = 3,84 ; *p-value* = 0,278 non significatif

**Test de Pearson Chi2 P = 4,81 ; *p-value* = 0,187 non significatif

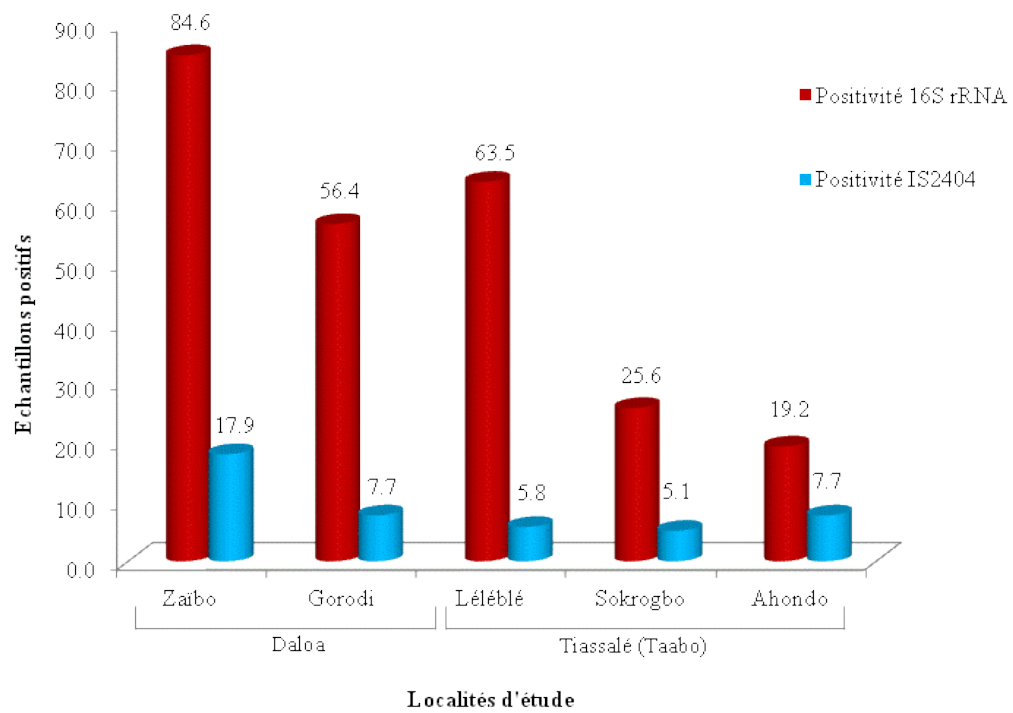


Figure 16 : Distribution des mycobactéries non tuberculeuses selon les localités

3.2.2. Identification des potentiels réservoirs animaux au sein de l'environnement

3.2.2.1. Diversité au sein des petits mammifères capturés

Une diversité d'espèces est observée au sein des petits mammifères capturés à travers les localités (**Tableau XI**). Différentes espèces de rongeurs sont identifiées avec une prédominance de l'espèce *Mastomys natalensis* qui a représenté la majorité des rongeurs capturés avec 74,8 % (84/111). Les autres espèces sont *Crocidura spp.* (11,7 %), *Rattus spp.* (9,0 %), *Mus musculoides* (1,8 %), *Praomys rostratus* (1,8 %) et *Iophuromys sikapusi* (0,9 %).

3.2.2.2. Détection des lésions chez les petits mammifères

Les données présentées à ce niveau concernent les échantillons prélevés sur les cas de rongeurs présentant des lésions suspectes.

Concernant la détection des lésions au niveau des petits mammifères, 8 cas de rongeurs présentant des lésions externes suspectes sont observés, soit 7, 2 %, sur les 111 petits mammifères capturés (**Tableau XII**).

Tous les petits mammifères observés avec des lésions sont identifiés comme appartenant à l'espèce *Mastomys natalensis* (**Tableau XIII**). Les localisations des lésions sont différentes selon les animaux à savoir la queue, la patte arrière, la patte avant, l'abdomen, le côté latéral (flanc) ou l'arrière train. Un nombre identique d'animaux présentant des lésions est observé aussi bien chez les individus mâles que femelles, tous étant au stade adulte. Au moins un animal présentant une lésion suspecte est retrouvé au sein de chaque localité et ces cas de petits mammifères avec des lésions sont tous capturés dans les habitations.

Tableau XI : Diversité de capture au sein des petits mammifères capturés

Espèces	Nombre d'animaux captures	Pourcentage (%)
<i>Mastomys natalensis</i>	83	74,8
<i>Crocidura oliveri</i>	9	8,1
<i>Crocidura poensis</i>	4	3,6
<i>Rattus rattus</i>	9	8,1
<i>Rattus norvegicus.</i>	1	0,9
<i>Mus musculoides</i>	2	1,8
<i>Praomys rostratus</i>	2	1,8
<i>Lophuromys sikapusi</i>	1	0,9
Total	111	100

Tableau XII : Distribution par localité des petits mammifères présentant des lésions externes suspectes

Département	Localité	Absence de lésions	Présence de lésions
Daloa	Zaïbo	10	1
	Gorodi	32	2
Tiassalé (Taabo)	Léléblé	30	1
	Sokrogbo	11	3
	Ahondo	20	1
Total		103	8

Tableau XIII : Données sur les petits mammifères présentant des lésions suspectes

Département	Communauté	Lieu de capture	Code animal	Espèce	Sexe/Stade	Localisation lésion	Type d'échantillon
Daloa	Zaïbo (Niessoko)	Habitation	ZN1	<i>Mastomys natalensis</i>	Femelle Adulte	Non spécifiée	Biopsie Ecouvillon
	Gorodi (Ponagbeu)	Habitation	GP3a	<i>Mastomys natalensis</i>	Femelle Adulte	Queue	Biopsie
		Habitation	GP6	<i>Mastomys natalensis</i>	Femelle Adulte	Patte arrière droite	Biopsie Ecouvillon
Tiassalé (Taabo)	Léléblé (Djandjikro)	Habitation	LDj3a	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adulte	Patte arrière gauche	Biopsie Ecouvillon
	Sokrogbo (Troko)	Habitation	ST1	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adulte	Abdomen	Biopsie
	Sokrogbo (Kpala)	Habitation	SK3a	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adulte	Côté latéral	Ecouvillon
		Habitation	SK3b	<i>Mastomys natalensis</i>	Femelle Adulte	Patte avant gauche	Aspiration aiguille fine
	Ahondo (Awlobo 1)	Habitation	AA1-2a	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adulte	Arrière train	Ecouvillon

L'amplification du gène 16S rRNA puis de la séquence d'insertion IS2404 des échantillons prélevés au niveau des lésions suspectes a permis d'identifier les MNT chez 5 petits mammifères (**Figure 17**).

L'analyse des organes associés aux animaux ayant des lésions positives pour les MNT a également permis de détecter l'ADN de *Mycobacterium spp.* pour certains organes. L'amplification du gène ER à partir des échantillons de lésions positifs aux MNT n'a révélé aucune positivité (**Tableau XIV**).

Après séquençage des fragments d'ADN des échantillons de lésions testés positifs aux MNT suivi d'un BLAST, une similarité de séquences est observée selon les échantillons pour différentes bactéries notamment les MNT et *M. ulcerans* (**Tableau XIV**). Plus précisément, *Corynebacterium kutscheri* MYL-3 est détectée sur 3 petits mammifères codés GP6, ST1 et AA1-2a avec des lésions situées respectivement à la patte arrière, à l'abdomen et à l'arrière train. *Arthrobacter spp.* est également identifiée sur l'animal codé GP6 montrant la possible infection multiple chez ces petits mammifères.

Par ailleurs, 2 lésions localisées à la patte avant gauche et à la queue, respectivement pour les petits mammifères codés SK3b et GP3a (**Figure 18**) sont identifiées comme infectées par *M. ulcerans* (Agy99, Accession N° CP000325.1), GenBank. Ces petits mammifères ayant une positivité pour *M. ulcerans* avec respectivement 94 % et 98 % de similarité de séquences sont capturés dans les localités de Sokrogbo (Département de Tiassalé - Taabo).et Gorodi (Département de Daloa).

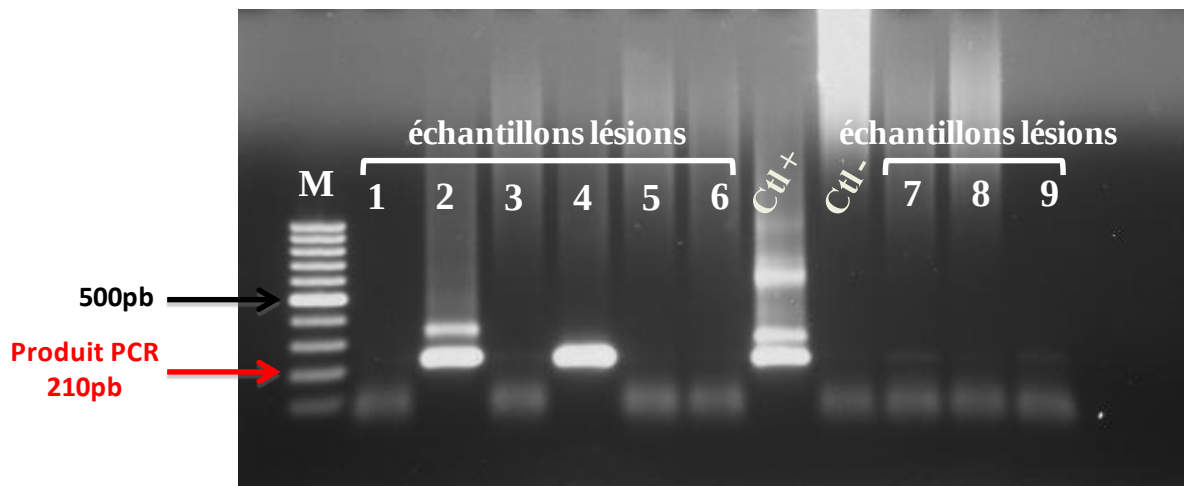


Figure 17: Détection des mycobactéries non tuberculeuses après amplification du gène IS2404 à partir des lésions suspectes observées sur les petits mammifères

M: marqueur de poids moléculaire de 1Kb (100 pb pour chaque intervalle) ; **Ctl+:** contrôle positif (souche positive de *M. ulcerans*) ; **Ctl-:** contrôle négatif (eau stérile) ; lignes 1-6, 7-9: échantillons des lésions testés.

Tableau XIV: Identification des bactéries présentes au niveau des lésions testées positives chez les petits mammifères

Code animal	Localisation lésion	Positivité IS2404 lésion	Positivité ER lésion	Positivité 16S rRNA organes	Souche identifiée pour lésion (% similarité de séquence)
GP3a	Queue	Biopsie	aucune	SP, KI, LI, LU, STO, AS, SI, CS, HT	<i>M. ulcerans</i> Agy99 (98%)
GP6	Patte arrière	Biopsie, Ecouvillon	aucune	SP, KI, LI, LU, STO, AS, HT	<i>Corynebacterium kutscheri</i> souche MYL-3 (86%) <i>Arthrobacter spp.</i> (75%)
ST1	Abdomen	Biopsie	aucune	SP, KI, LI, LU, STO, AS, CS, HT	<i>Corynebacterium kutscheri</i> souche MYL-3 (99%)
SK3b	Patte avant	Aspiration aiguille fine	aucune	SP, KI, LI, LU, AS, HT	<i>M. ulcerans</i> Agy99 (94%)
AA1-2a	Arrière train	Ecouvillon	aucune	LS, SP, KI, LI, STO, AS, CS	<i>Corynebacterium kutscheri</i> souche MYL-3 (98%)

SP : rate ; **KI** : rein ; **LI** : foie ; **LU** : poumon ; **STO** : estomac ; **AS** : écouvillon anal ; **SI** : petit intestin ; **CS** : caecum ; **HT** : cœur.

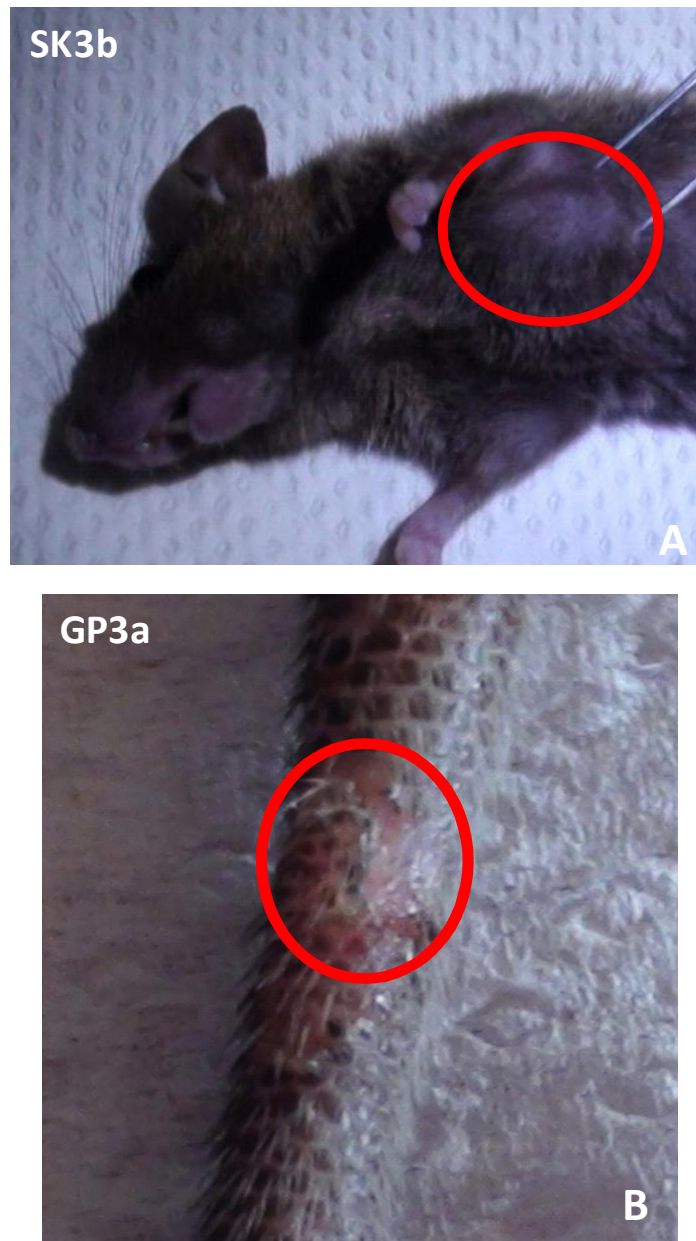


Figure 18 : Lésions suspectes externes observées sur des petits mammifères capturés au sein des communautés

A : nodule au niveau de la patte avant ; **B** : ulcération au niveau de la queue

3.3. Comparaison des isolats bactériens identifiés et modèle de transmission

Les cas d'infections par *M. ulcerans* sont observés avec les différents tests d'amplification. En l'absence d'amplification efficace des loci VNTR notamment au niveau des matrices de l'environnement, les infections détectées sont confirmées avec le séquençage des fragments d'ADN amplifiés par PCR. Différentes distributions sont observées pour les cas d'infection au sein des populations. Il en est de même pour les environnements aquatiques spécifiques contaminés issus des localités ainsi que les cas de petits mammifères capturés présentant des lésions suspectes. A travers chaque distribution, la présence des MPM est confirmée par l'analyse des séquences (**Tableau XV**).

Dans la localité de Zaïbo (Département de Daloa), un cas d'infection à *M. liflandii* 128 FXT chez l'homme est confirmé. Cette MPM est également détectée pour les points d'eau Gbouwa et Tourou alors qu'une souche de mycobactérie présentant 96 % de similarité avec la souche *M. ulcerans* Agy 99 est identifiée au niveau de la rivière la Lobo.

Dans la localité de Gorodi (Département de Daloa), un cas d'infection humaine à une souche présentant 92 % de similarité avec la souche *M. liflandii* 128 FXT est identifié et cette MPM ainsi que *Mycobacterium spp.* sont retrouvées dans les points d'eau Godo et Nidrou 2. Dans cette même localité, une souche présentant une similarité de 98 % avec la souche *M. ulcerans* Agy 99 est impliquée dans un cas d'infection de rongeur. Des pathogènes autres que les MNT présentant respectivement 86 % et 75 % de similarité avec les souches *Corynebacterium kutscheri* MYL-3 et *Arthrobacter spp.* sont retrouvées dans le second cas d'infection de rongeur.

Dans la localité de Léléblé (Département de Tiassalé), deux cas d'infection humaine à des souches présentant respectivement 96 % et 99 % de similarité avec la souche *M. ulcerans* Agy 99 sont confirmés. Une co-infection à une souche présentant 98 % de similarité avec la souche *M. liflandii* 128 FXT est également observée pour l'un de ces deux cas. Une souche présentant 99 % de similarité avec cette même MPM est identifiée dans les points d'eau N'ziba et Lahôbloua de cette localité.

Dans la localité de Sokrogbo, une souche présentant une forte similarité avec *M. ulcerans* Agy99 serait confirmée dans un cas d'infection humaine et animale. Un autre cas d'infection animale (rongeur) à *Corynebacterium kutscheri* MYL-3 serait confirmé. Une souche présentant 99 % de similarité avec la souche *M. liflandii* 128 FXT est identifiée dans le point d'eau Woudigné de cette localité.

Dans la localité d'Ahondo, trois cas probables d'infection humaine à *M. ulcerans* Agy99 sont mis en évidence. Toutefois, deux de ces cas représenteraient des co-infection à des souches similaires aux souches *M. marinum* et *M. pseudoshottsii*. Dans cette même localité, une contamination du fleuve Bandama avec une souche présentant 96 % de similarité avec la souche *M. liflandii* 128 FXT est détectée tandis qu'un cas d'infection animale à *Corynebacterium kutscheri* MYL-3 serait identifié.

En outre, en s'appuyant sur le concept 'One Health', un modèle d'interaction et de transmission de ces isolats de MNT depuis l'environnement vers l'homme via de potentiels réservoirs animaux est proposé (**Figure 19**).

Ce modèle prend en compte les trois composantes que sont l'homme, l'animal et l'environnement et suggérerait une transmission des mycobactéries dépendant du chevauchement entre les habitats écologiques de l'homme, de l'animal (petit mammifère) et des MNT notamment *M. ulcerans*.

Ainsi, les activités socio-économiques y représentent le point focal d'interaction et donc d'infection avec les MNT. Lors de ces activités, les risques d'infection sont identifiés à travers le contact d'une peau fragilisée avec des matrices environnementales contaminées notamment les biofilms se formant à la surface des points d'eau ou au niveau des plantes aquatiques. Le risque d'infection par le contact avec des sources animales comme les rongeurs porteurs d'infection et proliférant dans l'environnement proche de l'homme y est également suggéré.

Tableau XV: Identification des isolats bactériens présents au sein des localités

Département	Localité	Homme		Environnement		Animal	
		Code Ech	Bactérie identifiée et % de similarité +	Code Ech	Bactérie identifiée et % de similarité +	Code Ech	Bactérie identifiée et % de similarité +
Daloa	Zaïbo	SZ1	<i>*M.liflandii</i> 128FXT, 97%	ZGD2	<i>*M. liflandii</i> 128FXT, 89%		NA
				ZTF1	<i>*M. liflandii</i> 128FXT, 89%		
				ZLB5	<i>*M. ulcerans</i> Agy99, 96%		
	Gorodi	SG2	<i>*M.liflandii</i> 128FXT, 92%	GGB4	<i>*Mycobacterium</i> sp. YM-1 DNA, insertion sequence:IS2404 96%	GP3a	<i>*M. ulcerans</i> Agy99 98%
				GN2B5	<i>*M. liflandii</i> 128FXT, 97%	GP6	<i>*Corynebacterium kutscheri</i> MYL-3 86%
Tiassalé (Taabo)	Léléblé	SL2	<i>*M. ulcerans</i> Agy99, 96%	LNB1	<i>*M. liflandii</i> 128FXT, 99%		NA
		SL3	<i>**M. ulcerans</i> Agy99, 99% ; <i>*M. liflandii</i> 128FXT, 98%	LLF1	<i>*M. liflandii</i> 128FXT, 99%		
	Sokrogbo	SS2	<i>M. ulcerans</i> Agy99, ****93% et **99%	SWD3	<i>*M. liflandii</i> 128FXT, 99%	ST1	<i>Corynebacterium kutscheri</i> MYL-3 99%
						SK3b	<i>*M. ulcerans</i> Agy99, 94%
	Ahondo	SA2	<i>*M. ulcerans</i> Agy99, 96% ;**** <i>M. Marinum</i> , 99%	ABS2	<i>*M. liflandii</i> 128FXT, 96%	AA1-2a	<i>Corynebacterium kutscheri</i> MYL-3 98%
		SA9	<i>**M. ulcerans</i> Agy99, 96%				
		SA10	<i>M. ulcerans</i> Agy99, *****88% et ****93% <i>*M. pseudoshottsii</i> L15 insertion sequence IS2404-like, partial sequence 95%				

+ : bactérie présentant un pourcentage de similarité avec celles existantes dans la banque de données NCBI ; **NA** : non amplifié ; * : IS2404 ; ** : MIRU1 ; *** : Locus 6 ; **** : ST1 ; ***** : Locus 19 ont représenté le type de gène utilisé pour l'identification de l'isolat bactérien après séquençage.

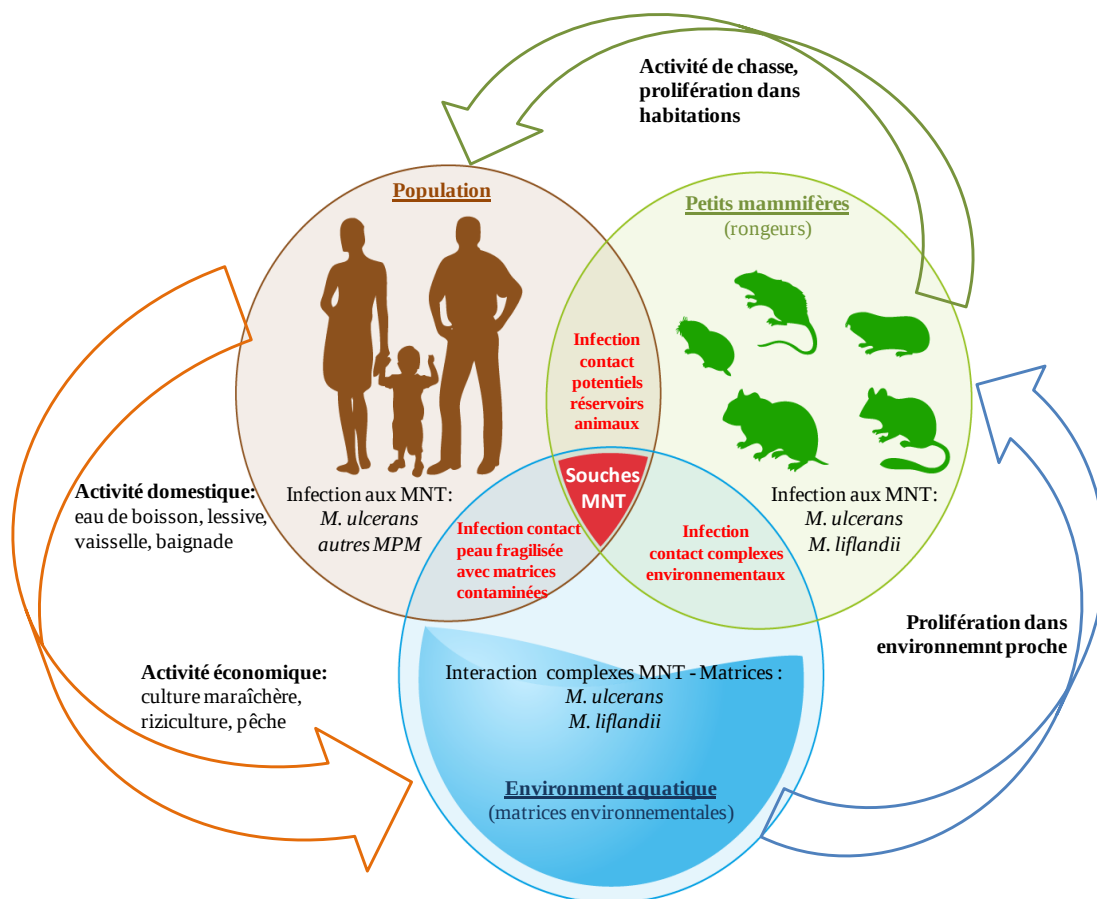


Figure 19 : Modèle de transmission basé sur le concept 'One Health' à l'interface homme-animal-environnement

IV - DISCUSSION

Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT), en particulier les mycobactéries productrices de mycolactone (MPM), sont d'une grande importance en raison de leur pathogénie dans l'apparition de graves ulcérations chez les animaux et l'homme (**Fyfe et al., 2010**). De ce fait, une meilleure compréhension de leur épidémiologie et leur écologie, s'avère importante pour le contrôle de la propagation des maladies que ces mycobactéries causent, en particulier l'infection à *M. ulcerans* dans le cas de l'ulcère de Buruli (UB).

En raison des difficultés à obtenir des cultures pures de *M. ulcerans* à partir de l'environnement, la plupart des études effectuées ont eu à détecter le matériel génétique de *M. ulcerans* au sein de divers environnements aquatiques. D'autres études ont associé cette détection génomique à la charge de la maladie, suggérant que les points d'eau à faible mobilité étaient des réservoirs potentiels de *M. ulcerans* (**Marsollier et al., 2004b; Williamson et al., 2008**).

Toutefois, en raison de la grande distribution de ces agents pathogènes au sein de l'environnement comparée à celle des infections focales observées au sein des populations humaines (**Roltgen et al., 2010; Williamson et al., 2012**), la traçabilité de la source d'infection depuis les environnements contaminés devrait débuter par un échantillonnage systématique des environnements à risque suspectés. La comparaison des isolats issus de ces environnements à risque avec ceux responsables d'infections chez l'homme est primordiale pour l'élucidation des possibles voies de transmission.

Cette étude a été réalisée autour de trois objectifs clés à savoir (1) l'établissement du profil moléculaire de *M. ulcerans* au sein des populations, (2) l'identification des environnements aquatiques contaminés par les MNT ainsi que les potentiels réservoirs animaux, (3) la comparaison des différents isolats et/ou fragments d'ADN de MNT identifiées permettant de déterminer les possibles modes de transmission. Aussi, les données issues de cette étude soutiendraient-elles l'hypothèse selon laquelle la transmission des MNT notamment *M. ulcerans* dépendrait du chevauchement des habitats écologiques de ces pathogènes, de l'homme et des animaux. Il faut noter que le chevauchement majeur se produit au niveau des points d'eau environnementaux où les populations sont exposées aux risques d'infection aux mycobactéries à travers l'utilisation de l'eau pour la boisson, la baignade (**Primm et al., 2004**).

Pourtant, l'étude sociologique effectuée dans le cadre du projet global a montré que chaque localité dispose d'au moins une pompe d'eau potable. Par ailleurs, l'identification des activités socio-économiques majeures au sein des communautés (activités agricoles et pêche) a montré que celles-ci les exposent grandement aux points d'eau ; ces derniers ayant été identifiés comme contaminés par les MNT notamment *M. ulcerans*.

4.1. Identification des environnements aquatiques contaminés par les mycobactéries non tuberculeuses

L'abondance des points d'eau au sein de chaque localité a permis de couvrir une superficie de points de contacts représentative de l'exposition des populations aux environnements contaminés par les MNT. En ce qui concerne les échantillons environnementaux, par souci d'avoir un meilleur rendement de contamination à mycobactéries, les échantillons ont été prélevés en double (filtrats), triple (détritus et sols) et quintuple exemplaires (biofilms). Cette méthode de prélèvement a permis d'augmenter la probabilité de retrouver des mycobactéries ou du matériel génétique bactérien au sein des matrices collectées, et d'assurer une positivité pour l'ADN génomique qui serait représentatif de l'ensemble de la surface du point d'eau (**Williamson et al., 2008; Williamson et al., 2012**).

Le screening initial réalisé pour identifier les mycobactéries (*Mycobacterium spp*) après amplification du gène ARNr 16S (16S rRNA) sur l'ensemble des échantillons environnementaux (N= 195) a identifié 103 échantillons positifs soit 52,8 %. Les filtrats d'eau ont représenté les matrices avec la plus grande positivité (66,7 %) et les sols celles avec la plus petite positivité (44.4 %). Cette positivité plus importante pour les filtrats d'eau contraste avec les travaux de Williamson (**Williamson et al., 2008; Williamson et al., 2012**) qui ont rapporté une plus grande positivité au niveau des biofilms.

De même, après amplification de la séquence d'insertion IS2404, au niveau des positifs ARNr 16S, un résultat similaire est observé avec les filtrats d'eau qui ont présenté le plus fort taux de positivité (16,7 %) et les sols qui ont été les moins positifs (2,2 %). Les échantillons précédemment positifs pour ARNr 16S mais testés négatifs pour IS2404 ne seraient donc des MNT d'intérêt ; la séquence d'insertion IS2404 ayant été rapportée seulement pour les MNT également productrices de mycolactone (MPM) (**Yip et al., 2007**).

Bien qu'aucune amplification du marqueur ER n'ait pu être positive pour les échantillons environnementaux testés, la présence relative des MPM y compris *M. ulcerans* a pu être vérifiée après séquençage des échantillons testés positifs IS2404, y compris dans les biofilms comme rapporté par Williamson (**Williamson et al., 2012**). La positivité observée au niveau des filtrats d'eau a permis de vérifier la présence de bacilles à l'interface air-eau (**Wendt et al., 1980**). Certains biofilms sont recueillis à partir de plantes et herbes aquatiques ce qui suggérerait que le contact de ces plantes avec des microtraumatismes cutanés ou des plaies ouvertes pourrait faciliter le contact avec des MNT notamment *M. ulcerans* à partir des biofilms contaminés (**Marsollier et al., 2004b**). De plus, pour Marsollier, les extraits bruts de certaines plantes aquatiques réduiraient de moitié le

temps de doublement de *M. ulcerans* favorisant ainsi la formation de biofilms.

Bien que le rôle exact de la formation de biofilms dans la survie et la prolifération de *M. ulcerans* n'ait pas été étudié, les études sur les bactéries ayant des plasmides ont montré que le transfert de matériel génétique entre les espèces co-existantes ne serait pas rare (**Becq et al., 2007; Doig et al., 2012**). Il a été démontré que *M. ulcerans* aurait évolué de *M. marinum* par acquisition du plasmide de 174 kpb (**Stinear et al., 2007**).

Ainsi, vu que l'évolution au sein des populations de microorganismes serait continue, il serait possible que les mycobactéries non productrices de mycolactone (non MPM) formant des biofilms avec d'autres MPM puissent acquérir ce trait de pathogénie (**Ranger et al., 2006**). Les études dans ce domaine assez innovateur pourraient aider à mieux comprendre le rôle des biofilms dans la facilitation de la prolifération des MPM et leur diffusion dans les écosystèmes aquatiques.

Par ailleurs, la positivité au gène ARNr 16S et/ou à la séquence d'insertion IS2404 est observée pour la majorité des points d'eau échantillonnés. En effet, tous les points d'eau sont positifs pour au moins un des deux tests, à l'exception du point d'eau Djapipo Barrage dans la localité d'Ahondo (Département de Tiassalé). Cette absence d'amplification des gènes d'intérêt pour les échantillons de ce point d'eau pourrait éventuellement être attribuée à une grande présence d'inhibiteurs environnementaux (acides humiques, complexes polysaccharides) qui minimiserait ainsi l'action de la BSA qui devrait réduire cette inhibition.

De manière générale, la positivité aux deux marqueurs est plus importante pour les points d'eau Tourou, la Lobo et Gbouwa dans la localité de Zaïbo (Département de Daloa). Il faut noter que les points d'eau qui s'écoulent plus lentement seraient un facteur majeur quant à la présence des MNT car facilitant la fixation des biofilms sur les biotopes et par conséquent, la survie, la prolifération et la persistance de ces mycobactéries. Les points d'eau à mobilité plus rapide quant à eux, faciliteraient mieux leur diffusion tout en délogeant les biofilms de leur lieu d'attachement.

Les données présentées ont donc montré la distribution relative des MNT au sein des points d'eau dans les cinq localités endémiques de l'UB. Même si l'amplification des loci VNTR n'a pu être effectuée pour les échantillons testés positifs aux MNT, l'analyse des séquences positives ARNr 16S mais surtout IS2404 a permis d'identifier les MPM impliquées dans la contamination des points d'eau notamment *M. liflandii* et *M. ulcerans*.

Lors de l'étude sociologique effectuée dans le cadre du projet global, il a été observé que chaque localité dispose d'au moins une source d'eau potable, mais ces populations ont toujours recours aux sources d'eau environnementales. Pourtant, l'identification des activités socio-économiques majeures au sein des communautés (activités agricoles et pêche) a montré que celles-

ci les exposent grandement aux sources de contamination issues de ces points d'eau ; ces derniers ayant été identifiés comme contaminés par les MNT notamment *M. ulcerans*.

4.2. Etablissement du profil moléculaire de *Mycobacterium ulcerans* au sein des populations

Concernant les cas cliniques d'infection rencontrés au sein des populations, la positivité des fragments d'ADN à la séquence d'insertion IS2404 est utilisée pour mesurer la distribution des mycobactéries au sein des communautés (**Stinear et al., 1999**). Les localités avec le plus grand nombre d'échantillons collectés et de fragments positifs ont été Ahondo et Sokrogbo dans le département de Tiassalé. La confirmation des cas d'UB est également complétée avec l'amplification du gène ER pour lequel seulement 6 échantillons ont montré une positivité avec une majorité pour la communauté d'Ahondo. Certains de ces positifs étant obtenus après ré amplification du marqueur pour une meilleure détection.

Cela contraste légèrement avec les résultats de Williamson et collaborateurs qui ont amplifié de façon adéquate en une seule réaction la séquence du gène ER (**Williamson et al., 2012**). Ainsi, une ré amplification des négatifs ER-PCR permettrait d'amplifier les faibles quantités de fragments non détectées et écarterait les faux négatifs observés. Le taux de négativité pourrait être dû à une faible quantité d'ADN de départ

Les échantillons positifs sont par la suite soumis à une discrimination par typage avec les loci VNTR (MIRU1, locus 6, ST1, locus 19). Le nombre de répétition correspondant pour les tailles des bandes de chaque locus VNTR est calculé à partir de leurs séquences correspondantes. Le locus 19 et MIRU 1 sont polymorphiques alors que le locus 6 et ST1 sont monomorphiques. L'utilisation des quatre loci a permis d'augmenter le pouvoir de discrimination du typage VNTR, ce qui a abouti à l'obtention d'un plus grand nombre de génotypes de *M. ulcerans*.

Ces résultats obtenus sont différents des données rapportées par (**Hilty et al., 2006**) ainsi que (**Williamson et al., 2008**), qui ont utilisé deux et trois loci, respectivement. Pour cette étude, les loci 19 et MIRU1 sont les principaux déterminants des génotypes établis.

Sur l'ensemble des profils VNTR établis lors de la présente étude, le profil Q (3, 1, 2, 2) est identifié comme correspondant au profil C (3, 1, 2), l'un des trois profils A, B et C de *M. ulcerans*, circulant en Afrique de l'Ouest précédemment décrits (**Williamson et al., 2008**).

En effet, pour chacun des profils (C et Q), trois, une et deux copies sont amplifiées respectivement avec MIRU1, locus 6 et ST1. Seul le locus 19, pour lequel deux copies sont

observées dans cette étude, n'a pas été pris en compte dans le profil C décrit par ces auteurs. La similarité de ces profils VNTR confirme donc la présence de cette souche de *M. ulcerans* au sein des localités d'étude notamment dans le Département de Tiassalé (Taabo).

Cette observation est également établie par (Ngazoa-Kakou *et al.*, 2015) qui, après typage VNTR d'échantillons cliniques issus de différentes régions de Côte d'Ivoire, ont identifié le génotype C de *M. ulcerans*. Le profil VNTR S (1, 1, -, -) correspondrait au profil A (1, 1, 2) décrit par Williamson et collaborateurs avec une copie de MIRU1, une copie du locus 6 et deux copies de ST1 (Williamson *et al.*, 2008). Toutefois, en l'absence de l'amplification de ST1 au cours de cette étude, une confirmation reste à établir.

La diversité génétique observée à travers les différents profils moléculaires rejoint également de précédents travaux qui l'ont démontré dans des régions endémiques de l'UB au Ghana et en Côte d'Ivoire (Williamson *et al.*, 2008; Narh *et al.*, 2015; Ngazoa-Kakou *et al.*, 2015). Cependant, une autre étude réalisée en Côte d'Ivoire n'a pu mettre en évidence cette diversité d'isolats de *M. ulcerans* (Coulibaly-N'Golo *et al.*, 2011). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les loci utilisés soient différents ; le locus 6 étant le seul en commun avec cette étude. Par ailleurs, les génotypes établis sont également différents des autres génotypes issus d'études ayant utilisé les mêmes loci VNTR.

L'amplification des loci VNTR afin de différencier *M. ulcerans* des autres MPM reste d'intérêt car pour bon nombre d'études réalisées à l'échelle sous régionale notamment au Ghana, une homogénéité intra-espèce au sein des isolats a été vérifiée (Ablordey *et al.*, 2005a; Stragier *et al.*, 2005; Hilty *et al.*, 2006).

La difficulté d'amplification des loci VNTR pourrait être résolue en utilisant une plus grande quantité de matériel génétique extrait après le contrôle de la qualité de l'ADN (utilisation d'un Nanodrop pour la mesure de la concentration d'ADN et vérification de sa pureté) ; ou en palliant les effets des inhibiteurs présents en grande quantité dans les matrices environnementales par l'utilisation d'anti-inhibiteurs.

Un meilleur génotypage permettrait ainsi, une comparaison et une traçabilité des isolats depuis l'environnement jusqu'à l'homme comme réalisé dans une étude similaire au Ghana (Narh *et al.*, 2015), avec l'identification de possibles voies de transmission des MNT notamment *M. ulcerans*.

En outre, malgré quelques insuffisances et l'absence de détection de bactéries viables, les données obtenues suggéreraient que les points d'eau se retrouvant au sein des localités seraient contaminés par les MNT et par conséquent représenteraient des sources d'infection pour les

populations. D'autres analyses comme la culture bactérienne, les tests biochimiques et le séquençage d'autres loci pourraient aider à une meilleure discrimination de ces isolats.

4.3. Identification de potentiels réservoirs animaux de *Mycobacterium ulcerans* au sein de l'environnement

En ce qui concerne l'identification de potentiels réservoirs animaux notamment les petits mammifères, les données ont montré la détection de *M. ulcerans* sur le rongeur africain *Mastomys natalensis*. Ces rongeurs sont issus des localités de Gorodi (Département de Daloa) et Sokrogbo (Département de Tiassalé), deux localités endémiques de l'UB respectivement au Centre-ouest et Sud est de la Côte d'Ivoire.

La majorité des animaux capturés appartient à l'espèce *Mastomys natalensis*. En effet, ce rongeur étant le plus répandu et fréquent en Afrique subsaharienne est un transporteur naturel de maladies animales vers l'environnement domestique proche, notamment celui de l'homme. Cela pourrait s'expliquer par son port semi-commensal mais également des facteurs spécifiques liés à son comportement et son l'écologie en particulier, son taux de propagation exceptionnellement élevé (Coetzee, 1975).

Après l'amplification du gène ARNr 16S et de la séquence d'insertion IS2404, une positivité est observée pour deux lésions (biopsie de la queue et aspiration par l'aiguille fine sur la patte avant). Le séquençage des échantillons positifs a montré respectivement 98 % et 94 % de similarité de séquence à *M. ulcerans* Agy99. De plus, le séquençage des autres lésions suspectes positives pour le gène ARNr 16S a montré la présence d'autres bactéries notamment *Corynebacterium kutscheri* et *Arthrobacter spp.*

La détection des infections mycobactériennes chez les petits mammifères dans cette étude rejoint les résultats d'études antérieures. En effet, des études menées au Bénin afin d'identifier les réservoirs de *M. ulcerans* chez les mammifères terrestres ont montré la présence d'autres mycobactéries chez les rongeurs et les insectivores africains (Durnez *et al.*, 2008) et plus particulièrement différentes mycobactéries ont été détectés chez les petits mammifères dans les zones endémiques de l'UB (Durnez *et al.*, 2010).

Dans ce contexte, bien que des études antérieures menées dans un village endémique de l'UB (Ananekrom) dans la région Ashanti au Ghana n'aient pu détecter *M. ulcerans* dans les organes ou fèces de rongeurs et musaraignes, l'hypothèse que ces petits mammifères terrestres peuvent faire partie du réservoir de *M. ulcerans* n'a pas été rejetée (Vandelannoote *et al.*, 2010).

Comme montré précédemment, les petits mammifères des zones endémiques de l'UB

pourraient également présenter des lésions externes similaires à celles observées chez l'homme. Cela souligne le fait que ces animaux qui partagent le même environnement que les populations humaines pourraient également être infectés par *M. ulcerans* avec des lésions caractéristiques de l'UB. En outre, des essais expérimentaux avec des aulacodes ont également révélé que ces petits rongeurs pourraient présenter des lésions caractéristiques de l'UB lorsqu'ils sont infectés par *M. ulcerans* (**Addo et al., 2007**).

En Australie, d'autres mammifères terrestres ont été associés à la transmission de l'UB depuis la détection de l'ADN de *M. ulcerans* dans les fèces d'opossums au sein de sites endémiques de l'UB (**Fyfe et al., 2010**). Cela souligne le rôle majeur des petits mammifères dans l'écologie de *M. ulcerans* quant à leur susceptibilité à l'infection.

Par ailleurs, Durnez et collaborateurs ont observé que l'ADN de *M. ulcerans* n'a pas été trouvé chez le petit mammifère *Rattus rattus* piégé au Bénin même s'il a été détecté chez la même espèce en Australie ; cela pourrait être dû à un mode spécifique de contamination chez les mammifères australiens. Ils ont donc suggéré que les rongeurs pourraient être infectés par *M. ulcerans* en mangeant des excréments d'opossums contaminés alors que cette même source de *M. ulcerans* pourrait être absente au Bénin (**Durnez et al., 2008**).

De la même manière, Fyfe et collaborateurs ont suggéré une ingestion de *M. ulcerans* par les opossums, à partir de l'environnement ou une infection par le biais d'un insecte vecteur. Ils ont également suggéré que les opossums pourraient amplifier et disséminer *M. ulcerans* dans l'environnement puis, de potentiels vecteurs seraient contaminés depuis cet environnement ou au contact des opossums infectés (**Fyfe et al., 2010**).

Aussi, la transmission à l'homme pourrait-elle se produire par l'intermédiaire de ces vecteurs ou par contact direct avec l'environnement contaminé. Ces hypothèses accentueraient le fait que les hommes et les animaux pourraient probablement être infectés par contact avec des sources environnementales de *M. ulcerans* (**Portaels et al., 2001**).

Ainsi, en ce qui concerne le rôle possible des petits mammifères dans la dissémination des MNT notamment *M. ulcerans*, le mode de contamination de l'environnement à l'homme devrait être lié au chevauchement et au partage des habitats écologiques qui favoriseraient les voies de contamination. En effet, à partir des observations faites sur le terrain, il est apparu que le mode de vie des populations et les comportements socioculturels dans ces communautés rurales puissent probablement augmenter le contact avec des animaux contaminés du fait du chevauchement et partage des environnements.

Un point à vérifier serait la corrélation possible entre l'endémicité de l'UB au sein d'une région et le taux de détection de *M. ulcerans* au niveau de ces petits mammifères. En raison du

faible nombre de spécimens testés dans cette étude, cette corrélation n'a pu être réalisée. Cependant, en Australie, une corrélation positive a été observée avec des échantillons prélevés dans les zones d'endémie et testés positifs pour *M. ulcerans* par rapport à des échantillons prélevés dans des zones non endémiques.

Un autre point qui pourrait aider à comprendre la contamination possible par les rongeurs serait l'importance de leur écologie, principalement celle des spécimens présents dans les zones africaines et impliqués dans la survie et le cycle de transmission de *M. ulcerans*.

Un dernier point pourrait être de déterminer, avec l'exemple d'un réservoir, si l'agent pathogène peut y être maintenu en permanence et si l'infection pourrait être transmise à partir de ce dernier vers la population cible (autres vecteurs, homme) (**Haydon et al., 2002**).

En outre, l'épidémiologie de la leptospirose, zoonose dans laquelle les rongeurs ont été identifiés comme réservoirs mais pour laquelle la maladie est acquise par contact avec l'eau contaminée, devrait également être envisagée comme modèle d'étude (**Adler et de la Pena Moctezuma, 2009**).

En définitive, il y a lieu de retenir que cette étude a permis d'évaluer la relative distribution des MNT impliquées dans les infections chez l'homme et l'animal ainsi que dans la contamination des environnements aquatiques, dans les localités endémiques.

En utilisant ces données, un modèle de transmission des MNT (notamment *M. ulcerans*) est proposé. L'une des caractéristiques distinctes dans ce modèle est le chevauchement des habitats écologiques de l'agent pathogène et de l'homme ainsi que les potentiels réservoirs animaux à travers les activités socio-économiques des populations.

Un mode possible de transmission critique dans ce modèle serait l'inoculation des MNT par le contact d'une peau fragilisée, du fait de plaies ou micro traumatismes cutanés ; ou les coupures par des brins d'herbes contaminés au niveau des points d'eau. Les enfants sembleraient être la population la plus exposée aux infections, car étant plus fréquemment en contact avec les points d'eau par leurs activités (loisirs ou recueil d'eau) (**Asiedu et Etuaful, 1998**).

Cela n'a pas été mentionné mais à l'inverse, ces points d'eau pourraient être à nouveau infectés lors de contact avec des populations infectées.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

La caractérisation moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses notamment *M. ulcerans*, a été effectuée dans cinq différentes localités de Côte d'Ivoire (Zaïbo, Gorodi, Léléblé, Sokrogbo, Ahondo), sélectionnées pour leur endémicité de l'ulcère de Buruli. Elle a concerné des populations humaines, des environnements aquatiques et des petits mammifères retrouvés au sein des localités étudiées.

En effet, après confirmation des cas d'infection cliniques au sein des départements de Daloa et Tiassalé (Taabo), la discrimination par typage VNTR a permis d'identifier dans le département de Tiassalé, le profil VNTR Q (3, 1, 2, 2) de *M. ulcerans*, précédemment décrit au niveau de l'Afrique de l'Ouest. Par ailleurs, d'autres profils VNTR ont également été établis dans ce département ; cela démontre une diversité génétique des isolats identifiés au sein des populations humaines.

De plus, des indicateurs de la présence des mycobactéries non tuberculeuses notamment les mycobactéries productrices de mycolactone (*M. ulcerans*, *M. liflandii*) ont été mis en évidence au niveau de la majorité des points d'eau échantillonnés dans l'environnement, tout particulièrement avec les filtrats d'eau. Cela montre que ces points d'eau seraient des sources de contamination pour l'homme. Le séquençage des fragments d'ADN amplifiés a confirmé la présence de ces mycobactéries au sein des points d'eau utilisés par les communautés. Le typage VNTR n'a pu être établi pour ces matrices environnementales collectées en l'absence d'amplification de certains des loci VNTR utilisés, nécessaires à l'établissement d'un génotype complet.

Par ailleurs, des potentielles sources de dissémination et contamination au sein des populations de petits mammifères (rongeurs) ont été mises en évidence. A partir des échantillons prélevés sur les cas d'ulcérations observés chez ces rongeurs, des cas d'infection à *M. ulcerans* ont été identifiés après amplification des gènes d'intérêt et séquençage. Le typage VNTR n'a pu être établi pour les cas d'infection animale identifiés en l'absence d'amplification de certains des loci VNTR utilisés, nécessaires à l'établissement d'un génotype complet.

Ainsi, la présence des mycobactéries productrices de mycolactone (*M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. liflandii* et *M. pseudoshootsii*) a été mise en évidence chez l'homme, l'animal et dans l'environnement. En ce qui concerne leur circulation et transmission à l'homme, l'absence de traçabilité des différentes isolats n'a pas permis de révéler leur similitude. Cependant, le chevauchement des habitats écologiques entre l'homme, l'animal et ces agents pathogènes ainsi que les activités socio-économiques des populations contribueraient à la dissémination de ces mycobactéries et donc aux risques de contamination chez l'homme comme c'est le cas pour l'ulcère

de Buruli.

Limites de l'étude

Au terme de cette étude, la question de la détermination des possibles modes de transmission des mycobactéries non tuberculeuses, depuis l'environnement jusqu'à l'homme, au sein des localités d'étude reste encore à explorer.

La mise en évidence des similitudes des isolats de mycobactéries identifiées, au sein des populations humaines et animales mais également dans l'environnement aquatique, permettrait de retracer les sources d'infection chez l'homme.

Cette traçabilité des isolats se ferait par un typage VNTR de fragments d'ADN provenant d'échantillons prélevés chez l'homme, l'animal et dans l'environnement aquatique ainsi qu'un isolement de souches de mycobactéries à partir de ces échantillons suivi d'un nouveau typage VNTR avec les souches obtenues.

Recommandations

Après restitution des résultats de cette étude et discussion sur les méthodes à appliquer et actions à mener avec les populations et organismes impliqués dans la lutte contre l'ulcère de Buruli, une meilleure prise en compte et anticipation des risques d'infection serait alors établie.

En termes de recommandations, d'une part il faudrait développer des outils d'information et de sensibilisation incluant toutes les sources de contamination identifiées à savoir :

- L'exposition aux points d'eau et plantes aquatiques,
- L'exposition aux rongeurs.

D'autre part, il faudrait encourager la mise en place des mesures préventives simples à savoir :

- Utiliser des vêtements protecteurs étanches avant tout contact avec les sources de contamination,
- Manipuler avec précaution les plantes aquatiques aux alentours des points d'eau,
- Protéger et isoler les plaies ou micro traumatismes cutanés, moyen d'infection par les mycobactéries, avant tout contact avec les environnements aquatiques à risque,
- Contrôler l'accès des enfants, cible principale de l'infection, aux points d'eau,
- Assainir les milieux de vie et habitations en vue de réduire et/ou stopper la prolifération des rongeurs.

Perspectives

Un nouveau typage VNTR des mycobactéries impliquées dans les cas de contamination au sein des localités d'étude devrait être effectué ; celui-ci incluant de nouveaux loci VNTR. Cela permettrait d'établir de meilleurs génotypes et de démontrer les similarités ou différences à l'interface homme-animal-environnement et entre les localités d'étude. Les points de chevauchement et possibles modes de transmission seraient alors identifiés suivant le modèle de transmission proposé.

L'isolement et la culture des mycobactéries en fonction du type d'échantillon (homme, animal, matrice environnementale) permettraient également d'établir les voies possibles de transmission après caractérisation moléculaire de ces souches.

Ces mycobactéries serviraient de souches de référence à l'infection de modèle animal. Ce modèle animal serait représenté par les rongeurs identifiés comme sources de dissémination des mycobactéries.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ablordey A., Amissah D. A., Aboagye I. F., Hatano B., Yamazaki T., Sata T., Ishikawa K. et Katano H. (2012).** Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**: e1590.
- Ablordey A., Fonteyne P.-A., Stragier P., Vandamme P. et Portaels F. (2007).** Identification of a new variable number tandem repeat locus in *Mycobacterium ulcerans* for potential strain discrimination among African isolates. *Clin Microbiol Infect*, **13**: 734-36.
- Ablordey A., Hilty M., Stragier P., Swings J. et Portaels F. (2005a).** Comparative nucleotide sequence analysis of polymorphic variable-number tandem-repeat Loci in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, **43**: 5281-4.
- Ablordey A., Swings J., Hubans C., Chemlal K., Locht C., Portaels F. et Supply P. (2005b).** Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, **43**: 1546-51.
- Adamba C. et Owusu A. Y. (2011).** Burden of Buruli ulcer: how affected households in a Ghanaian district cope. *Afr Stud Monogr*, **32**: 1 - 23.
- Addo P., Adu-Addai B., Quartey M., Abbas M., Okang I., Owusu E., Ofori-Adjei D. et Awumbila B. (2007).** Clinical and histopathological presentation of Buruli ulcer in experimentally infected grasscutters (*Thryonomys swinderianus*). *Internet J Trop Med* **3**:e2.
- Adler B. et de la Pena Moctezuma A. (2009).** Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, **140**: 287–96.
- Ahoua L., Aka N., Ekaza E., Bouzid S., N’Guessan R. et Dosso M. (2009).** Risk factors for Buruli ulcer in Côte d’Ivoire: Results of a case-control study. *Afr J Biotechnol* **8**: 536-46.
- Aiga H., Amano T., Cairncross S., Adomako J., Nanas O. K. et Coleman S. (2004).** Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. *Am J Trop Med Hyg*, **71**: 387-92.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. et Lipman D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**: 403-10.
- Alvarado-Esquivel C., Garcia-Corral N., Carrero-Dominguez D., Enciso-Moreno J., Gurrola-Morales T., Portillo-Gomez L., Rossau R. et Mijs W. (2009).** Molecular analysis of *Mycobacterium*

isolates from extrapulmonary specimens obtained from patients in Mexico. *BMC Clinical Pathology*, **9**: 1.

Amofah G., Bonsu F., Tetteh C., Okrah J., Asamoah K., Asiedu K. et Addy J. (2002). Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. *Emerg Infect Dis*, **8**: 167-70.

Asiedu K. et Etuaful S. (1998). Socioeconomic implications of Buruli ulcer in Ghana: a three-year review. *Am J Trop Med Hyg*, **59**: 1015-22.

Aujoulat I., Johnson C., Zinsou C., Guedenon A. et Portaels F. (2003). Psychosocial aspects of health seeking behaviours of patients with Buruli ulcer in southern Benin. *Trop Med Int Health*, **8**: 750-9.

Bartralot R., Pujol R. M., Garcia-Patos V., Sitjas D., Martin-Casabona N., Coll P., Alomar A. et Castells A. (2000). Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. *J Cutan Pathol*, **27**: 124-9.

Becq J., Gutierrez M. C., Rosas-Magallanes V., Rauzier J., Gicquel B., Neyrolles O. et Deschavanne P. (2007). Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli. *Mol Biol Evol*, **24**: 1861-71.

Behr M. A., Wilson M. A., Gill W. P., Salamon H., Schoolnik G. K., Rane S. et Small P. M. (1999). Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, **284**: 1520-3.

Benbow M. E., Williamson H., Kimbirauskas R., McIntosh M. D., Kolar R., Quaye C., Akpabey F., Boakye D., Small P. et Merritt R. W. (2008). Aquatic invertebrates as unlikely vectors of Buruli ulcer disease. *Emerg Infect Dis*, **14**: 1247-54.

Bretzel G., Siegmund V., Racz P., van Vloten F., Ngos F., Thompson W., Biason P., Adjei O., Fleischer B. et Nitschke J. (2005). Post-surgical assessment of excised tissue from patients with Buruli ulcer disease: progression of infection in macroscopically healthy tissue. *Trop Med Int Health*, **10**: 1199-206.

Brou T., Broutin H., Elguero E., Asse H. et Guegan J. F. (2008). Landscape diversity related to Buruli ulcer disease in Cote d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**: e271.

- Broussard G. W. et Ennis D. G. (2007).** *Mycobacterium marinum* Produces Long-Term Chronic Infections in Medaka: A New Animal Model for Studying Human Tuberculosis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **145**: 45-54.
- Brown-Elliott B. A., Nash K. A. et Wallace R. J. (2012).** Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, **25**: 545-82.
- Cassidy P. M., Hedberg K., Saulson A., McNelly E. et Winthrop K. L. (2009).** Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology. *Clin Infect Dis*, **49**: e124-e29.
- Chemlal K., Huys G., Fonteyne P. A., Vincent V., Lopez A. G., Rigouts L., Swings J., Meyers W. M. et Portaels F. (2001).** Evaluation of PCR-restriction profile analysis and IS2404 restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification and typing of *Mycobacterium ulcerans* and *M. marinum*. *J Clin Microbiol*, **39**: 3272-8.
- Chetchotisakd P., Kiertiburanakul S., Mootsikapun P., Assanasen S., Chaiwarith R. et Anunnatsiri S. (2007).** Disseminated nontuberculous mycobacterial infection in patients who are not infected with HIV in Thailand. *Clin Infect Dis*, **45**: 421-7.
- Chilima B. Z., Clark I. M., Floyd S., Fine P. E. et Hirsch P. R. (2006).** Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 2343-50.
- Clancey J., Dodge O., Lunn H. et Oduori M. (1961).** Mycobacterial skin ulcers in Uganda. *The Lancet*, **2**: 951-54.
- Claridge J. E. (2004).** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, **17**: 840-62.
- Coetzee C. G. (1975).** The biology, behaviour, and ecology of *Mastomys natalensis* in southern Africa. *Bull World Health Organ*, **52**: 637-44.
- Coulibaly-N'Golo G. M., Ekaza E., Coulibaly B., Aka N., N'Guessan R K., Thiberge J. M., Caro V., Brisse S. et Bretin-Dosso M. (2011).** Multilocus VNTR analysis of *Mycobacterium ulcerans* strains isolated in Côte d'Ivoire. *J Infect Dev Ctries*, **5**: 59-63.

- Debacker M., Portaels F., Aguiar J., Steunou C., Zinsou C., Meyers W. et Dramaix M. (2006).** Risk factors for Buruli ulcer, Benin. *Emerg Infect Dis*, **12**: 1325-31.
- Doannio J., Konan K., Dosso F., Kone A., Konan Y., Sankare Y., Ekaza E., Coulibaly N., Odehouri K., Dosso M., Sess E., Marsollier L. et Aubry J. (2011).** *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. *Med Trop* **71**: 53-57.
- Dobos K. M., Small P. L., Deslauriers M., Quinn F. D. et King C. H. (2001).** *Mycobacterium ulcerans* cytotoxicity in an adipose cell model. *Infect Immun*, **69**: 7182-6.
- Doig K. D., Holt K. E., Fyfe J. A., Lavender C. J., Eddyani M., Portaels F., Yeboah-Manu D., Pluschke G., Seemann T. et Stinear T. P. (2012).** On the origin of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of buruli ulcer. *BMC Genomics*, **13**: 258.
- Durnez L., Eddyani M., Mgone G. F., Katakweba A., Katholi C. R., Machang'u R. R., Kazwala R. R., Portaels F. et Leirs H. (2008).** First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Appl Environ Microbiol*, **74**: 768-73.
- Durnez L., Suykerbuyk P., Nicolas V., Barriere P., Verheyen E., Johnson C. R., Leirs H. et Portaels F. (2010).** Terrestrial small mammals as reservoirs of *Mycobacterium ulcerans* in benin. *Appl Environ Microbiol*, **76**: 4574-7.
- Eddyani M., Ofori-Adjei D., Teugels G., De Weirde D., Boakye D., Meyers W. M. et Portaels F. (2004).** Potential role for fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): an environmental study. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 5679-81.
- Einarsdottir T. et Huygen K. (2011).** Buruli ulcer. *Hum Vaccin*, **7**: 1198-203.
- Elsner L., Wayne J., O'Brien C. R., McCowan C., Malik R., Hayman J. A., Globan M., Lavender C. J. et Fyfe J. A. (2008).** Localised *Mycobacterium ulcerans* infection in a cat in Australia. *J Feline Med Surg*, **10**: 407-12.
- Falkinham J. O. (1996).** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, **9**: 177-215.

- Falkinham J. O. (2003a).** The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can J Infect Dis*, **14**: 281-6.
- Falkinham J. O. (2003b).** Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis*, **9**: 763-7.
- Falkinham J. O. (2009).** Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol*, **107**: 356-67.
- Falkinham J. O. (2010).** Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiol*, **5**: 951-60.
- Frehel C., de Chastellier C., Lang T. et Rastogi N. (1986a).** Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*, **52**: 252-62.
- Frehel C., Ryter A., Rastogi N. et David H. (1986b).** The electron-transparent zone in phagocytized *Mycobacterium avium* and other mycobacteria: formation, persistence and role in bacterial survival. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, **137B**: 239-57.
- Fyfe J. A., Lavender C. J., Handasyde K. A., Legione A. R., O'Brien C. R., Stinear T. P., Pidot S. J., Seemann T., Benbow M. E., Wallace J. R., McCowan C. et Johnson P. D. (2010).** A major role for mammals in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**: e791.
- George K. M., Pascopella L., Welty D. M. et Small P. L. (2000).** A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun*, **68**: 877-83.
- Gordon S. V., Brosch R., Billault A., Garnier T., Eiglmeier K. et Cole S. T. (1999).** Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*, **32**: 643-55.
- Grange J. M. (1982).** Mycobacteria and the Skin. *Int J Dermatol*, **21**: 497-503.
- Grange J. M. (1996).** The biology of the genus *Mycobacterium*. *J Appl Microbiol*, **81**: 1S-9S.
- Haydon D., Cleaveland S., Taylor L. et Laurenson M. (2002).** Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis*, **8**: 1468–73.

- Hayman J. (1985).** Clinical features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Australas J Dermatol*, **26**: 67-73.
- Hett E. C. et Rubin E. J. (2008).** Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol Mol Biol Rev*, **72**: 126-56.
- Hilty M., Kaser M., Zinsstag J., Stinear T. et Pluschke G. (2007).** Analysis of the *Mycobacterium ulcerans* genome sequence reveals new loci for variable number tandem repeats (VNTR) typing. *Microbiology*, **153**: 1483-7.
- Hilty M., Yeboah-Manu D., Boakye D., Mensah-Quainoo E., Rondini S., Schelling E., Ofori-Adjei D., Portaels F., Zinsstag J. et Pluschke G. (2006).** Genetic diversity in *Mycobacterium ulcerans* isolates from Ghana revealed by a newly identified locus containing a variable number of tandem repeats. *J Bacteriol*, **188**: 1462-5.
- Hong H., Demangel C., Pidot S. J., Leadlay P. F. et Stinear T. (2008).** Mycolactones: immunosuppressive and cytotoxic polyketides produced by aquatic mycobacteria. *Nat Prod Rep*, **25**: 447-54.
- Huber C. A., Ruf M. T., Pluschke G. et Kaser M. (2008).** Independent loss of immunogenic proteins in *Mycobacterium ulcerans* suggests immune evasion. *Clin Vaccine Immunol*, **15**: 598-606.
- Hughes M. S., Skuce R. A., Beck L. A. et Neill S. D. (1993).** Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol*, **31**: 3216-22.
- Islam M. S., Richards J. P. et Ojha A. K. (2012).** Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **10**: 1055-66.
- Janda J. M., & et Abbott S. L. (2007).** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*, **45**: 2761-4.
- Jogi R. et Tying S. K. (2004).** Therapy of nontuberculous mycobacterial infections. *Dermatol Ther*, **17**: 491-8.
- Johnson P. et Lavender C. (2009).** Correlation between Buruli ulcer and vector-borne notifiable diseases, Victoria, Australia. *Emerg Infect Dis*, **15**: 614-5.

- Johnson P. D., Azuolas J., Lavender C. J., Wishart E., Stinear T. P., Hayman J. A., Brown L., Jenkin G. A. et Fyfe J. A. (2007).** *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. *Emerg Infect Dis*, **13**: 1653-60.
- Johnson P. D., Stinear T., Small P. L., Pluschke G., Merritt R. W., Portaels F., Huygen K., Hayman J. A. et Asiedu K. (2005).** Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med*, **2**: e108.
- Kanga J., Kacou E., Kouamé K., Kassi K., Kaloga M., Yao J., M. Dion-Lainé M., Avoaka L., Yoboué-Yao P., Sangaré A., Ecra J., Ahogo C., Djédjé M., Kadiri A. et Ayé C. (2005).** La lutte contre l'ulcère de Buruli. Expérience de la Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*, **99**: 34-38.
- Kankya C., Muwonge A., Djonne B., Munyeme M., Opuda-Asibo J., Skjerve E., Oloya J., Edvardsen V. et Johansen T. B. (2011).** Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: public health significance. *BMC Public Health*, **11**: 320.
- Kaser M., Gutmann O., Hauser J., Stinear T., Cole S., Yeboah-Manu D., Dernick G., Certa U. et Pluschke G. (2009a).** Lack of insertional-deletional polymorphism in a collection of *Mycobacterium ulcerans* isolates from Ghanaian Buruli ulcer patients. *J Clin Microbiol*, **47**: 3640-6.
- Kaser M., Hauser J. et Pluschke G. (2009b).** Single nucleotide polymorphisms on the road to strain differentiation in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, **47**: 3647-52.
- Kaser M. et Pluschke G. (2008).** Differential gene repertoire in *Mycobacterium ulcerans* identifies candidate genes for patho-adaptation. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**: e353.
- Katoch V. M. (2004).** Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res*, **120**: 290-304.
- Kibadi K., Aujoulat I., Meyers W. M., Mokassa L., Muyembe T. et Portaels F. (2007).** Etude des appellations et des représentations attachées à l'infection à *Mycobacterium ulcerans* dans différents pays endémiques d'Afrique. *Med Trop*, **67**: 241-48.
- Komijn R. E., de Haas P. E. W., Schneider M. M. E., Eger T., Nieuwenhuijs J. H. M., van den Hoek R. J., Bakker D., van Zijderveld F. G. et van Soolingen D. (1999).** Prevalence of *Mycobacterium avium* in Slaughter Pigs in The Netherlands and Comparison of IS1245 Restriction

Fragment Length Polymorphism Patterns of Porcine and Human Isolates. *J Clin Microbiol*, **37**: 1254-59.

Kotlowski R., Martin A., Ablordey A., Chemlal K., Fonteyne P. et Portaels F. (2004). One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish. *J Med Microbiol*, **53**: 927–33.

Lavender C. J., Stinear T. P., Johnson P. D., Azuolas J., Benbow M. E., Wallace J. R. et Fyfe J. A. (2008). Evaluation of VNTR typing for the identification of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples from Victoria, Australia. *FEMS Microbiol Lett*, **287**: 250-5.

Mansfield K. G. et Lackner A. A. (1997). Simian immunodeficiency virus-inoculated macaques acquire *Mycobacterium avium* from potable water during AIDS. *J Infect Dis*, **175**: 184-7.

Marsollier L., Andre J. P., Frigui W., Reyssset G., Milon G., Carbonnelle B., Aubry J. et Cole S. T. (2007). Early trafficking events of *Mycobacterium ulcerans* within *Naucoris cimicoides*. *Cell Microbiol*, **9**: 347-55.

Marsollier L., Aubry J., Saint-Andre J. P., Robert R., Legras P., Manceau A. L., Bourdon S., Audrain C. et Carbonnelle B. (2003). Ecology and transmission of *Mycobacterium ulcerans*. *Pathol Biol (Paris)*, **51**: 490-5.

Marsollier L., Robert R., Aubry J., Saint Andre J. P., Kouakou H., Legras P., Manceau A. L., Mahaza C. et Carbonnelle B. (2002). Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 4623-8.

Marsollier L., Severin T., Aubry J., Merritt R. W., Saint Andre J. P., Legras P., Manceau A. L., Chauty A., Carbonnelle B. et Cole S. T. (2004a). Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 6296-8.

Marsollier L., Stinear T., Aubry J., Saint André J. P., Robert R., Legras P., Manceau A.-L., Audrain C., Bourdon S., Kouakou H. et Carbonnelle B. (2004b). Aquatic Plants Stimulate the Growth of and Biofilm Formation by *Mycobacterium ulcerans* in Axenic Culture and Harbor These Bacteria in the Environment. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 1097-103.

Marston B. J., Diallo M. O., Horsburgh C. R., Jr., Diomande I., Saki M. Z., Kanga J. M., Patrice G., Lipman H. B., Ostroff S. M. et Good R. C. (1995). Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg*, **52**: 219-24.

- Matsumura Y., Taki R. et Miyachi Y. (2012).** Case of Buruli ulcer due to *Mycobacterium ulcerans* ssp. *shinshuense* with distal cutaneous involvement and synovitis. *J Dermatol*, **39**: 80-3.
- Mensah-Quainoo E., Yeboah-Manu D., Asebi C., Patafuor F., Ofori-Adjei D., Junghanss T. et Pluschke G. (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**: 191-8.
- Merritt R. W., Walker E. D., Small P. L., Wallace J. R., Johnson P. D., Benbow M. E. et Boakye D. A. (2010).** Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**: e911.
- Meyers W., Shelly W., Connor D. et and Meyers E. (1974).** Human *Mycobacterium ulcerans* infections developing at sites of trauma to skin. *Am J Trop Med Hyg*, **23**: 919–23.
- Mitchell P. J., Jerrett I. V. et Snee K. J. (1984).** Skin ulcers caused by *Mycobacterium ulcerans* in koalas near Bairnsdale, Australia. *Pathology*, **16**: 256-60.
- Mosi L., Williamson H., Wallace J. R., Merritt R. W. et Small P. L. (2008).** Persistent association of *Mycobacterium ulcerans* with West African predaceous insects of the family belostomatidae. *Appl Environ Microbiol*, **74**: 7036-42.
- Mve-Obiang A., Lee R. E., Portaels F. et Small P. L. (2003).** Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infect Immun*, **71**: 774-83.
- Mve-Obiang A., Lee R. E., Umstot E. S., Trott K. A., Grammer T. C., Parker J. M., Ranger B. S., Grainger R., Mahrous E. A. et Small P. L. (2005).** A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of *Xenopus* species with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the *Mycobacterium ulcerans* macrolide toxin. *Infect Immun*, **73**: 3307-12.
- Narh C. A., Mosi L., Quaye C., Dassi C., Konan D. O., Tay S. C. K., de Souza D. K., Boakye D. A. et Bonfoh B. (2015).** Source Tracking *Mycobacterium ulcerans* Infections in the Ashanti Region, Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* **9**: e0003437.
- Neumann M., Schulze-Robbeke R., Hagenau C. et Behringer K. (1997).** Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Appl Environ Microbiol*, **63**: 547-52.

- Ngazoa-Kakou E. S., Coulibaly-N'Golo D., Aka N., Vakou S., Aoussi S. et Dosso a. M. (2015).** Clonality of *Mycobacterium ulcerans* by Using VNTR-MIRU Typing in Ivory Coast (Côte d'Ivoire), West Africa. *Int J Trop Dis Health*, **7**: 163-71.
- Nienhuis W. A., Stienstra Y., Thompson W. A., Awuah P. C., Abass K. M., Tuah W., Awua-Boateng N. Y., Ampadu E. O., Siegmund V., Schouten J. P., Adjei O., Bretzel G. et van der Werf T. S. (2010).** Antimicrobial treatment for early, limited *Mycobacterium ulcerans* infection: a randomised controlled trial. *Lancet*, **375**: 664-72.
- Oloya J., Kazwala R., Lund A., Opuda-Asibo J., Demelash B., Skjerve E., Johansen T. B. et Djonne B. (2007).** Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. *BMC Microbiol*, **7**: 95.
- Oloya J., Opuda-Asibo J., Kazwala R., Demelash A. B., Skjerve E., Lund A., Johansen T. B. et Djonne B. (2008).** Mycobacteria causing human cervical lymphadenitis in pastoral communities in the Karamoja region of Uganda. *Epidemiol Infect*, **136**: 636-43.
- Owens D. W. (1978).** Atypical Mycobacteria. *Int J Dermatol*, **17**: 180-85.
- Phillips R., Horsfield C., Kuijper S., Lartey A., Tetteh I., Etuaful S., Nyamekye B., Awuah P., Nyarko K. M., Osei-Sarpong F., Lucas S., Kolk A. H. et Wansbrough-Jones M. (2005).** Sensitivity of PCR targeting the IS2404 insertion sequence of *Mycobacterium ulcerans* in an Assay using punch biopsy specimens for diagnosis of Buruli ulcer. *J Clin Microbiol*, **43**: 3650-6.
- Pidot S. J., Hong H., Seemann T., Porter J. L., Yip M. J., Men A., Johnson M., Wilson P., Davies J. K., Leadlay P. F. et Stinear T. P. (2008).** Deciphering the genetic basis for polyketide variation among mycobacteria producing mycolactones. *BMC Genomics*, **9**: 462.
- Portaels F., Chemlal K., Elsen P., Johnson P. D., Hayman J. A., Hibble J., Kirkwood R. et Meyers W. M. (2001).** *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. *Rev Sci Tech*, **20**: 252-64.
- Portaels F., Elsen P., Guimaraes-Peres A., Fonteyne P. A. et Meyers W. M. (1999).** Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet*, **353**: 986.
- Portaels F., Fonteyne P. A., de Beenhouwer H., de Rijk P., Guedenon A., Hayman J. et Meyers M. W. (1996).** Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. *J Clin Microbiol*, **34**: 962-5.

- Portaels F., Meyers W. M., Ablordey A., Castro A. G., Chemlal K., de Rijk P., Elsen P., Fissette K., Fraga A. G., Lee R., Mahrous E., Small P. L., Stragier P., Torrado E., Van Aerde A., Silva M. T. et Pedrosa J. (2008).** First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the environment. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**: e178.
- Primm T. P., Lucero C. A. et Falkinham J. O. (2004).** Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, **17**: 98-106.
- Radomski N., Cambau E., Moulin L., Haenn S., Moilleron R. et Lucas F. S. (2010).** Comparison of Culture Methods for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Surface Waters. *Appl Environ Microbiol*, **76**: 3514-20.
- Raghunathan P. L., Whitney E. A., Asamoah K., Stienstra Y., Taylor T. H., Jr., Amofah G. K., Ofori-Adjei D., Dobos K., Guarner J., Martin S., Pathak S., Klutse E., Etuaful S., van der Graaf W. T., van der Werf T. S., King C. H., Tappero J. W. et Ashford D. A. (2005).** Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* Infection): results from a case-control study in Ghana. *Clin Infect Dis*, **40**: 1445-53.
- Ranger B. S., Mahrous E. A., Mosi L., Adusumilli S., Lee R. E., Colorni A., Rhodes M. et Small P. L. (2006).** Globally distributed mycobacterial fish pathogens produce a novel plasmid-encoded toxic macrolide, mycolactone F. *Infect Immun*, **74**: 6037-45.
- Rastogi N., & et Barrow W. W. (1994).** Laboratory and clinical aspects of the *Mycobacterium avium* epidemic: contributing factors associated with variability of drug susceptibility and immune responsiveness, and the multifaceted nature of pathogenicity. *Res Microbiol*, **145**: 167-8.
- Rastogi N., Legrand E. et Sola C. (2001).** The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*, **20**: 21-54.
- Rhodes M. W., Kator H., Kotob S., van Berkum P., Kaattari I., Vogelbein W., Floyd M. M., Butler W. R., Quinn F. D., Ottinger C. et Shotts E. (2001).** A unique *Mycobacterium* species isolated from an epizootic of striped bass (*Morone saxatilis*). *Emerg Infect Dis*, **7**: 896-9.
- Rhodes M. W., Kator H., McNabb A., Deshayes C., Reytrat J. M., Brown-Elliott B. A., Wallace R., Jr., Trott K. A., Parker J. M., Lifland B., Osterhout G., Kaattari I., Reece K., Vogelbein W. et Ottinger C. A. (2005).** *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 1139-47.

- Rodgers A., Hutchison C. et Simpson M. (2008).** Methods for Sampling Small Mammals and their Habitats in Boreal Mixedwoods. *CNFER Technical Report TR-001. Ontario Ministry of Natural Resources, Centre for Northern Forest Ecosystem Research, Thunder Bay, Ontario, Canada*: 15 pp.
- Roltgen K., Qi W., Ruf M. T., Mensah-Quainoo E., Pidot S. J., Seemann T., Stinear T. P., Kaser M., Yeboah-Manu D. et Pluschke G. (2010).** Single nucleotide polymorphism typing of *Mycobacterium ulcerans* reveals focal transmission of buruli ulcer in a highly endemic region of Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**: e751.
- Ross B. C., Johnson P. D., Oppedisano F., Marino L., Sievers A., Stinear T., Hayman J. A., Veitch M. G. et Robins-Browne R. M. (1997).** Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. *Appl Environ Microbiol*, **63**: 4135-8.
- Runyon E. H. (1959).** Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*, **43**: 273-90.
- Runyon E. H. (1960).** Unclassified mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*, **81**: 428-9.
- Sakaguchi K., Iima H., Hirayama K., Okamoto M., Matsuda K., Miyasho T., Kasamatsu M., Hasegawa K. et Taniyama H. (2011).** *Mycobacterium ulcerans* infection in an Indian flap-shelled turtle (*Lissemys punctata punctata*). *J Vet Med Sci*, **73**: 1217-20.
- Sarfo F. S., Phillips R. O., Rangers B., Mahrous E. A., Lee R. E., Tarelli E., Asiedu K. B., Small P. L. et Wansbrough-Jones M. H. (2010).** Detection of Mycolactone A/B in *Mycobacterium ulcerans*-Infected Human Tissue. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**: e577.
- Schutte D., Umboock A. et Pluschke G. (2009).** Phagocytosis of *Mycobacterium ulcerans* in the course of rifampicin and streptomycin chemotherapy in Buruli ulcer lesions. *Br J Dermatol*, **160**: 273-83.
- Shamputa I. C., Rigouts A. L. et Portaels F. (2004).** Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens. *APMIS*, **112**: 728-52.
- Silva M. T., Portaels F. et Pedrosa J. (2007).** Aquatic insects and *Mycobacterium ulcerans*: an association relevant to Buruli ulcer control? *PLoS Med*, **4**: e63.

- Skerman V. B. D., McGowan V. et Sneath P. H. A. (1980).** Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol*, **30**: 225-420.
- Stienstra Y., van der Graaf W. T., Asamoah K. et van der Werf T. S. (2002).** Beliefs and attitudes toward Buruli ulcer in Ghana. *Am J Trop Med Hyg*, **67**: 207-13.
- Stinear T., Davies J. K., Jenkin G. A., Hayman J. A., Oppedisano F. et Johnson P. D. R. (2000a).** Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the Environment from Regions in Southeast Australia in Which It Is Endemic with Sequence Capture-PCR. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 3206-13.
- Stinear T. et Johnson P. D. R. (2007).** From *Marinum* to *Ulcerans*: a Mycobacterial Human Pathogen Emerges. *Microbe*, **2**.
- Stinear T., Ross B. C., Davies J. K., Marino L., Robins-Browne R. M., Oppedisano F., Sievers A. et Johnson P. D. (1999).** Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. *J Clin Microbiol*, **37**: 1018-23.
- Stinear T. P., Jenkin G. A., Johnson P. D. et Davies J. K. (2000b).** Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. *J Bacteriol*, **182**: 6322-30.
- Stinear T. P., Seemann T., Pidot S., Frigui W., Reyssset G., Garnier T., Meurice G., Simon D., Bouchier C., Ma L., Tichit M., Porter J. L., Ryan J., Johnson P. D., Davies J. K., Jenkin G. A., Small P. L., Jones L. M., Tekaiia F., Laval F., Daffe M., Parkhill J. et Cole S. T. (2007).** Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res*, **17**: 192-200.
- Stragier P., Ablordey A., Bayonne L., Lugor Y., Sindani I., Suykerbuyk P., Wabinga H., Meyers W. et Portaels F. (2006).** Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* Isolates from Africa. *Emerg Infect Dis*, **12**: 844-47.
- Stragier P., Ablordey A., Durnez L. et Portaels F. (2007).** VNTR analysis differentiates *Mycobacterium ulcerans* and IS2404 positive mycobacteria. *Syst Appl Microbiol*, **30**: 525-30.

- Stragier P., Ablordey A., Meyers W. M. et Portaels F. (2005).** Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Bacteriol*, **187**: 1639-47.
- Suykerbuyk P., Vleminckx K., Pasmans F., Stragier P., Ablordey A., Tran H. T., Hermans K., Fleetwood M., Meyers W. M. et Portaels F. (2007).** *Mycobacterium liflandii* infection in European colony of *Silurana tropicalis*. *Emerg Infect Dis*, **13**: 743-6.
- Tanghe A., Dangy J. P., Pluschke G. et Huygen K. (2008).** Improved protective efficacy of a species-specific DNA vaccine encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium ulcerans* by homologous protein boosting. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**: e199.
- Tartaglione T. (1997).** Treatment of nontuberculous mycobacterial infections: role of clarithromycin and azithromycin. *Clin Ther*, **19**: 626-38.
- Torrado E., Adusumilli S., Fraga A. G., Small P. L., Castro A. G. et Pedrosa J. (2007a).** Mycolactone-mediated inhibition of tumor necrosis factor production by macrophages infected with *Mycobacterium ulcerans* has implications for the control of infection. *Infect Immun*, **75**: 3979-88.
- Torrado E., Fraga A. G., Castro A. G., Stragier P., Meyers W. M., Portaels F., Silva M. T. et Pedrosa J. (2007b).** Evidence for an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun*, **75**: 977-87.
- Tortoli E. (2006).** The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **48**: 159-78.
- Tortoli E., Bartoloni A., Bottger E. C., Emler S., Garzelli C., Magliano E., Mantella A., Rastogi N., Rindi L., Scarparo C. et Urbano P. (2001).** Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. *J Clin Microbiol*, **39**: 4058-65.
- van der Werf T. S., Stienstra Y., Johnson R. C., Phillips R., Adjei O., Fleischer B., Wansbrough-Jones M. H., Johnson P. D., Portaels F., van der Graaf W. T. et Asiedu K. (2005).** *Mycobacterium ulcerans* disease. *Bull World Health Organ*, **83**: 785-91.
- van der Werf T. S., van der Graaf W. T., Groothuis D. G. et Knell A. J. (1989).** *Mycobacterium ulcerans* infection in Ashanti region, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **83**: 410-3.

- van Ingen J., Boeree M. J., Dekhuijzen P. N. et van Soolingen D. (2009).** Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clin Microbiol Infect*, **15**: 888-93.
- van Ingen J., Boeree M. J., van Soolingen D. et Mouton J. W. (2012).** Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat*, **15**: 149-61.
- van Zyl A., Daniel J., Wayne J., McCowan C., Malik R., Jelfs P., Lavender C. J. et Fyfe J. A. (2010).** *Mycobacterium ulcerans* infections in two horses in south-eastern Australia. *Aust Vet J*, **88**: 101-6.
- Vandelannoote K., Durnez L., Amissah D., Gryseels S., Dodoo A., Yeboah S., Addo P., Eddyani M., Leirs H., Ablordey A. et Portaels F. (2010).** Application of real-time PCR in Ghana, a Buruli ulcer-endemic country, confirms the presence of *Mycobacterium ulcerans* in the environment. *FEMS Microbiol Lett*, **304**: 191-4.
- Wallace R. J., Jr., Brown B. A. et Griffith D. E. (1998).** Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol*, **52**: 453-90.
- Walsh D. S., Meyers W. M., Krieg R. E. et Walsh G. P. (1999).** Transmission of *Mycobacterium ulcerans* to the nine-banded armadillo. *Am J Trop Med Hyg*, **61**: 694-7.
- Walsh D. S., Portaels F. et Meyers W. M. (2010).** Recent advances in leprosy and Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection). *Curr Opin Infect Dis*, **23**: 445-55.
- Wendt S. L., George K. L., Parker B. C., Gruft H. et Falkinham J. O. (1980).** Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. *Am Rev Respir Dis*, **122**: 259-63.
- WHO. 2000.** Buruli ulcer: *Mycobacterium ulcerans* infection. In: Asiedu, K., Scherpbier, R. et Raviglione, M. (eds.). Geneva (WHO/CDS/CPE/GBUI/2000.1).
- WHO. 2008.** Buruli ulcer: progress report, 2004-2008. *Wkly Epidemiol Rec*.
- WHO. 2010.** Number of new cases of Buruli ulcer reported, 2010. *Global Health Observatory data*.
- WHO. 2012.** Buruli ulcer. *Fact sheet N° 199*.

- WHO. 2014.** Number of new cases of Buruli ulcer reported, 2014. *Global Health Observatory data*.
- WHO. 2015.** 10 Facts about Buruli ulcer. *Fact sheet N°199*.
- Williamson H. R., Benbow M. E., Campbell L. P., Johnson C. R., Sopoh G., Barogui Y., Merritt R. W. et Small P. L. C. (2012).** Detection of *Mycobacterium ulcerans* in the Environment Predicts Prevalence of Buruli Ulcer in Benin. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**: e1506.
- Williamson H. R., Benbow M. E., Nguyen K. D., Beachboard D. C., Kimbirauskas R. K., McIntosh M. D., Quaye C., Ampadu E. O., Boakye D., Merritt R. W. et Small P. L. (2008).** Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**: e205.
- Willson S., Kaufman M., Merritt R., Williamson H., Malakauskas D. et Benbow M. (2013).** Fish and amphibians as potential reservoirs of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer disease. *Infect Ecol Epidemiol*, **3**: 19946.
- Yeboah-Manu D., Asante-Poku A., Asan-Ampah K., Ampadu E. D. et Pluschke G. (2011a).** Combining PCR with microscopy to reduce costs of laboratory diagnosis of Buruli ulcer. *Am J Trop Med Hyg*, **85**: 900-4.
- Yeboah-Manu D., Bodmer T., Mensah-Quainoo E., Owusu S., Ofori-Adjei D. et Pluschke G. (2004).** Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens. *J Clin Microbiol*, **42**: 5875-6.
- Yeboah-Manu D., Danso E., Ampah K., Asante-Poku A., Nakobu Z. et Pluschke G. (2011b).** Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from swab and fine-needle-aspiration specimens. *J Clin Microbiol*, **49**: 1997-9.
- Yeboah-Manu D., Röltgen K., Opare W., Asan-Ampah K., Quenin-Fosu K., Asante-Poku A., Ampadu E., Fyfe J., Koram K., Ahorlu C. et Pluschke G. (2012).** Sero-Epidemiology as a Tool to Screen Populations for Exposure to *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**: e1460.
- Yip M. J., Porter J. L., Fyfe J. A. M., Lavender C. J., Portaels F., Rhodes M., Kator H., Colorni A., Jenkin G. A. et Stinear T. (2007).** Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and Other

Mycolactone-Producing Mycobacteria from a Common Mycobacterium marinum Progenitor. *J Bacteriol*, **189**: 2021-9.

Yoder S., Argueta C., Holtzman A., Aronson T., Berlin O. G., Tomasek P., Glover N., Froman S. et Stelma G. J. (1999). PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 2650-3.

ANNEXES

Annexe 1

Autorisation du Comité National d’Ethique (CNER) du Ministère de la Santé et de la Lutte contre le Sida



MINISTERE DE LA SANTE
ET DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA

CABINET

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE ET
DE LA RECHERCHE (CNER)

13320

N° _____/MSLS/CNER-P.

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

Abidjan, le

09 NOV 2011

Au

Docteur Lydia MOSI
Investigateur Principal
Centre Suisse de Recherche Scientifique
CHU Treichville - COTE D'IVOIRE

OBJET: Autorisation de mise en œuvre du projet de recherche intitulé « Etude des risques de transmission des mycobactéries non-tuberculeuses entre l'homme et les petits mammifères »

Docteur,

Au cours de la session du 13 juillet 2011, le Comité National d'Ethique (CNER) a examiné votre demande d'autorisation de mise en œuvre du projet cité en objet.

Sous cette perspective, il a été émis un avis favorable à l'utilisation de ce protocole. Par conséquent, je donne un avis favorable à la mise en œuvre telle que soumise Comité National d'Ethique.

Toutefois, il faut noter que la validité de cette autorisation est d'un an à compter de la date de signature.

Par ailleurs, je vous saurai gré de bien vouloir transmettre au CNER une copie du rapport de cette étude.

Je vous prie d'agréer, **Docteur**, l'expression de mes salutations distinguées.

Pour le Ministre et par délégation
le Directeur de Cabinet

Prof AMONKOU A. Antoine



Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé des patients

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Titre de l'étude: Risques zoonotiques de mycobactéries non tuberculeuses entre humains et petits mammifères ; Transmission potentielle de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire et au Ghana

Investigateur Principal: Lydia Mosi

Adresse:

- Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS)

Km17 Route de Dabou, Adiopodoumé

01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Introduction:

Ce formulaire de consentement vous informe sur le contexte, les objectifs et la manière selon lesquels cette étude sera menée. De plus, il explique dans quelle mesure elle vous sera bénéfique, les risques potentiels et comment elle peut vous affecter. Enfin, il vous informe sur la raison pour laquelle vous avez été sélectionné et vos droits concernant la participation à cette étude.

Information Générale sur la Recherche

Les microbes qui ressemblent à ceux qui causent la tuberculose peuvent aussi vous affecter surtout quand vous avez d'autres maladies. Ces germes vivent dans l'environnement et peuvent se retrouver chez les poissons, les mammifères et les humains. L'un de ces groupes de germes est celui de ceux qui causent l'ulcère de Buruli (UB). Cette étude démontre que la

transmission de ces germes dépend du fait que les humains entrent en contact avec eux dans leur environnement.

L'étude est divisée en trois parties et nous espérons donner des informations sur la distribution de ces germes. Cela se fera en recherchant des cas de maladies chez les humains et les animaux de petite taille tels que les aulacodes, dans le but de déterminer le nombre ayant de telles maladies. La deuxième partie se penchera sur la manière dont les germes affectent les animaux et les humains vivant à proximité les uns des autres et enfin, l'identification en laboratoire de ces germes provenant des zones d'étude décrites. On croit qu'il existe des diagnostics erronés parce que ces infections ne sont pas signalées par les personnes, ce qui pourtant est très important pour les hommes et les animaux.

Chez l'homme, ces germes causant la maladie représentent sur le plan mondial un problème majeur de santé en particulier, dans les pays en développement comme le Ghana et la Côte d'Ivoire. Le nombre de décès dus à la maladie chez les animaux constituent toujours l'une des plus grosses pertes de revenus dans l'agriculture et la conservation de la faune locale. Dans cette étude, un grand accent sera mis sur l'identification de la présence de *Mycobacterium ulcerans* (le germe qui provoque l'ulcère de Buruli) dans l'environnement et chez l'homme au niveau des sites d'étude. Cela, à cause de la grande importance de l'ulcère de Buruli en tant que maladie tropicale négligée émergente en Côte d'Ivoire et au Ghana. L'on ne sait pas si ce germe peut se transmettre des animaux aux hommes aussi, les informations obtenues à partir de cette étude seront-elles essentielles dans la formulation des politiques qui aideront à prévenir et à éradiquer l'ulcère de Buruli. Des échantillons seront prélevés sur des patients présentant des lésions suspectes et des ulcères par des médecins et autres personnes qualifiées. Les échantillons prélevés suivant les directives de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) seront sous forme de liquides, d'écouvillons provenant de lésions ou de petits tissus de peau du patient. Les échantillons obtenus seront stockés de manière appropriée et transportés jusqu'au CSRS et NMIR pour un traitement ultérieur. Tous les échantillons seront soumis à des diagnostics et confirmations de cas.

Risques et Désagréments:

Il n'y a pas de risques majeurs liés à votre participation à cette étude en dehors de la légère gêne que vous pouvez avoir durant le nettoyage de plaies pour la collecte de l'échantillon ; les échantillons seront prélevés qu'une seule fois.

Avantages Possibles:

Le traitement de l'ulcère de Buruli est gratuit dans les hôpitaux. Il n'y aura pas de bénéfice direct pour la participation des sujets à cette étude. Les patients diagnostiqués avec d'autres infections seront conseillés en conséquence sur les options de traitement. Cependant, le principal avantage de votre participation est indirect vu que vous nous aiderez à déterminer la prévalence (le nombre) des maladies mycobactériennes environnementales en Côte d'Ivoire et au Ghana. A la fin de l'étude, vous auriez été d'une grande aide pour la prévention des effets néfastes de la maladie dans votre communauté.

Confidentialité:

Vos dossiers seront conservés dans un endroit sûr au CSRS et NMIR. Tous les renseignements recueillis au cours de l'étude seront stockés dans un fichier qui ne portera pas votre nom mais un numéro d'étude assigné. Seule l'équipe de recherche aura accès aux noms associés aux numéros d'étude et pour des raisons particulières comme le traitement. Il est probable que les données obtenues à partir de tests effectués sur vous soient publiés dans des revues médicales, mais votre nom ne sera pas utilisé.

Compensation:

Les patients identifiés avec l'ulcère de Buruli, ainsi que d'autres lésions seront conseillés sur les choix de traitement ; les traitements appropriés devant être administrés gratuitement. Aucune somme d'argent ne sera versée aux participants ou aucun cadeau ne sera donné.

Participation volontaire et droit de quitter le Projet de Recherche:

Vous avez le droit de ne pas participer à l'étude si vous ne le voulez pas, et cela n'affectera de quelque façon votre communauté et vous-même. Le refus de participer à cette étude ou votre retrait de cette étude n'aura pas de pénalités ou de perte d'avantages auxquels vous pouvez

avoir droit. Votre position dans la communauté ne sera également en aucune façon affectée, même si vous décidez de ne pas participer à l'étude.

Contacts pour Information Complémentaire:

Dr. Lydia Mosi (Investigateur Principal)

- Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire

01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Tél : +225 23 47 27 90 / +225 03 48 89 57

- Email: lmosi@noguchi.mimcom.org; lmosi@hotmail.com

Vos droits en tant que Participant :

Cette recherche a été examinée et approuvée par la Comité Nationale d'Ethique de la Recherche (CNER). Si vous avez des questions concernant vos droits en tant que participant à la recherche, vous pouvez communiquer avec le bureau du CNER au contact suivant :

- Président CNER

Prof. Louis PENALY

Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Tél : +225 01 50 41 42

Vous pouvez également communiquer avec les personnes suivantes pour tout complément d'information:

- Président du Comité Ethique CSRS

Prof. Eliezer N'Goran

Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire

01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

- Directeur Général CSRS

Prof. Bassirou Bonfoh

Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire

01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Tél : + 225 23 47 27 90

Email : Bassirou.bonfoh@csrs.ci

Accord Volontaire

J'ai lu ce formulaire de consentement. J'ai reçu des réponses satisfaisantes à mes questions. Je comprends que ma participation est volontaire. Je connais le but, les méthodes, les risques et les avantages possibles de l'étude pour juger que je veux y participer. Je consens volontairement à permettre à ma communauté de participer à cette étude. Je comprends que j'ai le droit de me retirer de l'étude à tout moment, et je sais que je peux faire appel à un membre de l'équipe d'étude si j'ai des questions ou des préoccupations.

Nom du participant _____

Nom du Parent _____ Signature du participant/parent _____

Nom du témoin _____ Signature du témoin _____

Signature du Chercheur Principal _____

Date _____ Lieu _____

(Numéro d'identification de l'étude attribué à cette participation) _____

Si les volontaires ne peuvent pas lire le formulaire eux-mêmes, un témoin doit signer ici:

J'étais présent lorsque les avantages, les risques et les procédures ont été lus au volontaire. Toutes les questions ont été répondues et le bénévole a accepté de participer à la recherche.

Date _____ Signature du Témoin _____

Je certifie que la nature et le but, les avantages potentiels et les risques possibles associés à la participation à cette étude ont été expliqués à l'individu ci-dessus.

Date _____

Signature de la personne qui a obtenu le consentement _____

Annexe 3 : Questionnaire ménage

CSRS

Centre Suisse de Recherches
Scientifiques en Côte d'Ivoire



Enquête sur les perceptions des facteurs de risque de l'ulcère de Buruli dans les zones endémiques de la Côte d'Ivoire (Daloa et Taabo)

QUESTIONNAIRE MENAGE

Q1	Nom et prénom de l'enquêteur :	
Q2	Numéro du questionnaire : / _ / _ / _ / _	
Q3	Date de l'enquête : / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _ / _	
Q4	Durée de l'enquête Début (Heure)..... Fin (Heure).....	 / _ // _ /
Q5	Village d'enquête 1. Léléblé 2. Ahondo 3. Sokrogbo 4. Gorodi 5. Zaïbo	/ _ /
Q6	Précisez le nom du quartier	/ _ // _ /
Q7	Si campement, précisez le nom du campement	/ _ /

Q8	Région d'enquête 1. Taabo 2. Daloa	/ _ /
----	------------------------------------	-------

NOTE INTRODUCTIVE

Le Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire et ses partenaires mènent une étude sur les facteurs de risques de contamination de l'ulcère de Buruli dans votre localité. Nous voudrions vous poser quelques questions relatives à votre niveau de connaissance de la maladie.

Ces questions seront adressées au chef de ménage ou à son substitut. Cet entretien durera environ **30min**.

Toutes les informations recueillies resteront strictement confidentielles. La participation à cette étude est volontaire et vous pouvez refuser de répondre à ces questions. Nous espérons cependant que vous accepterez de participer à cette étude afin d'éradiquer l'ulcère de Buruli dans votre zone. Avez-vous des questions particulières?

SECTION I : CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES DU CHEF DE MENAGE

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q10 1	Nom et prénom :			
Q10 2	Sexe	1. Masculin 2. Féminin	/ _ /	
Q10 3	Age	/ _ / _ / ans	/ _ / _ /	
Q10 4	Pays d'origine	1. Côte d'Ivoire 2. Burkina Faso 3. Guinée 4. Mali 5. Autres	/ _ /	Si # 1, allez à Q106

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q10 5	Si ivoirien, ethnies d'origine	1. Akan (baoulé, ébrié, agni, abron, attié...) 2. Mandé (malinké, dioula, bambara, yacouba, gouro, gagou...) 3. Krou (bété, krou, wobé, dida, guéré, niaboua...) 4. Gour (sénoufo, lobi, tagbana ; koulango...) 5. Autres.....	/__/	
Q10 6	Situation matrimoniale	1. Célibataire 2. Marié 3. Divorcé 4. Veuf/veuve	/__/	
Q10 7	Activité socioéconomique		/__//__/	
Q10 8	Religion	1. Chrétien 2. Musulman 3. Animiste 4. Autre.....	/__/	
Q10 9	Niveau d'étude	1. Aucun 2. Coranique 3. Primaire 4. Secondaire 5. Supérieur	/__/	

SECTION II : CADRE PHYSIQUE ET HUMAIN DU MENAGE

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q201	Certains membres de votre ménage vivent-ils dans maisons champêtres au cours de l'année ?	1. Oui 2. Non	/__/	Si non, allez à Q204
Q202	Si oui, à quelle période de l'année se déplacent-ils ?	1. En saison sèche 2. En saison pluvieuse 3. A toutes les saisons	/__/	
Q203	Combien de temps dure leur séjour ?	/__/_/ Semaines	/__/_/	
Q204	Y-a-t-il dans votre ménage actuel des membres ayant vécu dans d'autres villages ?	1. Oui 2. Non	/__/	
Q205	Y-a-t-il dans votre ménage actuel des membres ayant vécu dans d'autres ménages du village ?	1. Oui 2. Non	/__/	
Q206	Quel type d'animaux élevez-vous?	1. Poulet/canard/pintade 2. Porcs 4. Moutons 8. Chèvres 16. Chiens 32. Chats 64. Vache	/__//__//__/	Si Aucun, allez à Q208

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		128. Aucun. 256. Autre		
Q207	Dans quel endroit sont gardés ces animaux ?	1. Aucun 2. Enclos 3. Parc 4. Autre.....	/ _ /	
Q208	Y-a-t-il des membres de votre ménage qui pratiquent la chasse ou la capture d'animaux ?	1. Oui 2. Non	/ _ /	
Q209	Au niveau du village, quels sont les animaux généralement capturés ?	1. Agouti 2. Gazelle 4. Singe 8. Lapin 16. Rat 32. Ecureuil 64. Porc-épic 128. Serpent 256. Autre.....	/ _ // _ // _ /	Si Autre = Aucun, allez à Q211

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q210	A quelle saison de l'année pratique t-on la chasse dans le village?	1. Saison sèche 2. Saison pluvieuse 3. Toutes les saisons	/__/	
Q211	Y-a-t-il des membres de votre ménage qui font la pêche ?	1. Oui 2. Non	/__/	Si non, allez à Q214
Q212	Si oui, où vont-ils pêcher ? (Préciser le nom)	A. Rivière 1 Oui 2 Non B. Marigot 1 Oui 2 Non C. Fleuve 1 Oui 2 Non	/__/ /__/ /__/	
Q213	A quelle saison de l'année pratiquent-ils la pêche ?	1. Saison sèche 2. Saison pluvieuse 3. Toutes les saisons	/__/	
Q214	Y-a-t-il des membres de votre ménage qui pratiquent des activités de cueillette et de ramassage ?	1. Oui 2. Non	/__/	Si non, allez à Q301
Q215	Si oui, quels sont les produits ramassés ou cueillis ?	A.Escargot 1 Oui 2 Non B.Plantes médicinales 1Oui 2Non C.Champignons 1 Oui 2 Non	/__/ /__/	

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		D. Bois de chauffe 1 Oui 2 Non E. Feuilles comestibles 1 Oui 2 Non F. Ecorces 1 Oui 2 Non G. Condiments (Akpi...) 1 Oui 2 Non H. Autre 1 Oui 2 Non	/ _ / / _ / / _ / / _ / / _ / / _ /	

SECTION III : PERCEPTION DE L'ULCERE DE BURULI

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q30 1	Quelles sont les maladies fréquentes dans votre localité ?	1. Paludisme 2. Fièvre typhoïde 4. Diarrhée 8. Verminose 16. Ulcère de Buruli 32. Bilharziose 64. Rhumatisme	/ _ // _ // _ // _ /	

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		128. Hémorroïde 256. Toux 512. Autre.....		
Q30 2	Connaissez-vous l'ulcère de Buruli ?	1. Oui 2. Non	/ _ /	Si non, allez à Q406
Q30 3	Quels sont les symptômes de cette maladie ?	1. Boule/Bouton 2. Plaque 4. Plaie 8. Fièvre 16. Démangeaison 32. Mal de tête 64. Autre.....	/ _ // _ // _ /	
Q30 4	Quelles sont les causes de cette maladie ?	1. Eau sale 2. Animaux 4. Insectes 8. Herbes 16. Sorcellerie 32. Malédiction	/ _ // _ // _ /	

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		64. Autres.....		
Q30 5	Redoutez-vous cette maladie ?	1. Oui 2. Non	/__/	Si non, allez à Q307
Q30 6	Si oui, pourquoi la redoutez-vous ?	A. Maladie incurable 1.Oui 2.Non B.Soin coûteux 1.Oui 2. Non C. Maladie douloureuse 1.Oui 2.Non D.Maladie honteuse 1. Oui 2. Non E.Centre santé éloigné1.Oui 2.Non F. Autre 1. Oui 2. Non	/__/ /__/ /__/ /__/ /__/	
Q30 7	Si non, pourquoi ?	1. Guérison possible 2. Coût des soins abordable 4.Proximité du centre de santé 8. Autre.....	/__//__/	
Q30 8	Quelles sont les parties du corps humain qui sont particulièrement touchées ?	1. Bras 2. Corps 4. Jambes 8. Pieds	/__//__//__/	

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		16. Œil 32. Main 64. Parties génitales 128. Autres.....		
Q30 9	Quelles sont les conséquences de l'ulcère de Buruli ?	1. Cécité 2. Déformations des pieds 4. Déformations des bras 8. Déformations du tronc 16. Invalidité 32. Echec scolaire 64. Rejet par la société 128. Autre.....	/ __//__//__/	

SECTION IV : MODE DE TRANSMISSION DE L'ULCERE DE BURULI ET ACTIVITES DES POPULATIONS EN LIEN AVEC LE FLEUVE /MARIGOT /RIVIERE

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q40 1	Où peut-on attraper l'ulcère de Buruli ?	1. Partout 2. Près des points d'eau 4. Dans les champs	/ __//__/	

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		8. Dans la forêt 16. Autre..... ...		
Q40 2	Selon vous, comment une personne peut contracter l'ulcère de Buruli ?	1. Au contact d'une plaie infectée 2. En se baignant dans la même eau que le malade 4. Au contact du sol infesté 8. En partageant le repas avec le malade 16. Ne sais pas 32. Autre.....	/ _ // _ /	
Q40 3	Qui sont les personnes les plus touchées dans ce village?	1. Hommes 2. Femmes 4. Jeunes (Filles et Garçons) 8. Enfants 16. Paysans 32. Pêcheurs 64. Chasseurs	/ _ // _ // _ /	

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		128.Tout le monde 256. Ne sais pas 512.Autre.....		
Q40 4	Selon vous, l'ulcère de Buruli est-il une maladie héréditaire ?	1. Oui 2. Non	/ _ /	
Q40 5	Selon vous, l'ulcère de Buruli peut-il se transmettre par la sorcellerie ?	1. Oui 2. Non	/ _ /	
Q40 6	Avez-vous des pompes hydrauliques dans le village?	1. Oui 2. Non	/ _ /	Si non, allez à Q408
Q40 7	Si oui, combien de pompes avez-vous ?	/ _ // _ /	/ _ // _ /	
Q40 8	Quelles sont vos sources d'approvisionnement en eau potable?	1. Pompe hydraulique 2. Fleuve/rivière/marigot 4. Marre/étang/barrage 8. Puits 16. Citerne 32. Autres	/ _ // _ /	
Q40 9	Pourquoi avez-vous recours à cette source ?	1. Accessibilité 2. Proximité 4. Rapidité		

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		8. Appréciation du goût 16. Unique source d'approvisionnement en eau 32. En cas de panne(pompe) 64. Autres.....	/ __/ __/	
Q410	Qui sont ceux qui sont responsables de la collecte d'eau ?	1. Hommes 2. Femmes 3. Enfants 4. Les femmes et les enfants 5. Hommes et enfants 6. Hommes et femmes 7. Tout le monde	/ __/	
Q411	A quel moment de la journée fréquentez-vous ces points d'eau ?	1. Matin 2. Après-midi 4. Soir 8. N'importe quel moment	/ __/ __/	
Q412	Menez-vous certaines activités domestiques au fleuve/marigot	1. Oui 2. Non	/ __/	Si non, allez à Q414
Q413	Si oui, quelles sont les activités domestiques que vous menez dans le fleuve/marigot?	A. Lessive 1. Oui 2 Non B. Vaisselle 1. Oui 2 Non C. Bain 1 Oui 2 Non D. Boisson 1 Oui 2 Non E. Lavage manioc 1Oui 2Non F. Autre 1.Oui 2. Non	/ __/ / __/ / __/ / __/ / __/	

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
			/ _ /	
Q41 4	Menez-vous certaines activités de subsistance au fleuve/marigot/marre ?	1. Oui 2. Non	/ _ /	Si non, allez à Q417
Q41 5	Si oui, quelles sont les activités subsistance que vous menez en lien avec ces points d'eau?	A.Pêche 1. Oui 2. Non B.Arrosage plants culture 1.Oui 2.Non C.Culture irriguée 1. Oui 2.Non D.Abreuvage bétail 1. Oui 2. Non E. Autre 1. Oui 2. Non	/ _ / / _ / / _ / / _ / / _ /	Si Q415 A =non, allez à Q417
Q41 6	Si pêche, que pêchez-vous dans ces eaux ?	1. Poissons 2. Grenouilles 3. Les deux 4. Autres..... .	/ _ /	
Q41 7	Menez-vous certaines activités de loisirs au fleuve/marigot ?	1. Oui 2. Non	/ _ /	Si non, allez à Q420
Q41 8	Si oui, quelles sont les activités de loisirs que vous menez dans ces points d'eau ?	1. Baignade /Nage 2. Jeux 3. Autre.....	/ _ /	
Q41 9	A quelle période de l'année menez-vous cette activité ?	1. En saison pluvieuse 2. En saison sèche 3. A toutes les saisons	/ _ /	

N°	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q420	Quelle distance sépare votre habitation du point d'eau fréquenté ?	/ _ // _ // _ // _ / mètres	/ _ // _ // _ // _ /	
Q421	Quels types de champs utilisez-vous pour les cultures ?	1. Champs inondés 2. Champs irrigués 3. Champs secs 4. Champs labourés tous les ans 5. Forêts abattues 6. Pas de champ 7. Autre..... ..	/ _ /	Si pas de champ , allez à Q501
Q422	Quel moyen de déplacement utilisez-vous pour accéder à votre champ?	1. Marche 2. Pirogue 3. Marche et pirogue 4. Bicyclette 5. Voiture 6. Autre.....	/ _ /	

SECTION V : PRATIQUES PREVENTIVES LIEES A L'ULCERE DE BURULI

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q50 1	Comment faites vous pour éviter l'ulcère de Buruli ?	A. Ne vais pas à l'eau 1.Oui 2.Non B.Port de bottes pour le champ 1.Oui 2.Non C. Port de vêtements protecteurs 1.Oui 2.Non D. Ne fais rien 1.Oui 2.Non E. Autre 1. Oui 2. Non	/ _ / / _ / / _ / / _ / / _ /	
Q50 2	Êtes-vous sensibilisé sur l'ulcère de Buruli dans le village?	1. Oui 2. Non	/ _ /	Si non Q601
Q50 3	Si oui, qui est-ce qui fait la sensibilisation ?	1. ONG 2. Infirmier/Médecin 4. ASC 8.Autre.....	/ _ // _ /	
Q50 4	Comment se fait la sensibilisation?	A.Présentation images 1.Oui 2. Non B.Projection de films 1.Oui 2. Non	/ _ /	

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
		C.Echange populations 1 Oui 2 Non D.Séances de dépistage 1 Oui 2Non E.Autre 1. Oui 2. Non 	/__/ /__/ /__/ /__/ 	
Q50 5	Assistez-vous aux séances de sensibilisation ?	1. Oui 2. Non	/__/	
Q50 6	Si non, pourquoi ?			

SECTION VI : PRATIQUES CURATIVES LIEES A L'ULCERE DE BURULI

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q60 1	Avez-vous un ou des proches qui ont déjà contracté l'ulcère	1. Oui 2. Non	/__/	Si non, Q608

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
	de buruli ?			
Q60 2	Si oui, identifier ces personnes	A. Père 1. Oui 2. Non B. Mère 1. Oui 2. Non C. Fils/fille 1. Oui 2. Non D. Oncle/tante 1. Oui 2. Non E. Frère/sœur 1. Oui 2. Non F. Cousin/cousine 1.Oui 2Non G. Neveu/nièce 1. Oui 2.Non H. Autre 1. Oui 2. Non	/___/ /___/ /___/ /___/ /___/ /___/ /___/ /___/	
Q60 3	A quel stade a-t-on détecté la maladie ?	1. .Au stade pré-ulcératif (nodule, plaque, œdème) 2. Au stade ulcératif (plaie)	/___/	
Q60 4	Qui est-ce qui a détecté la maladie ?	1. Infirmier/médecin 2. Un membre de la famille 3. Le malade lui-même 4. Le tradipraticien 5. Autre.....	/___/	
Q60 5	A quel type de soins avez-vous eu recours pour sa guérison ?	1. Soins traditionnels 2. Soins modernes 3. Les deux	/___/	

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q60 6	A quel stade de sa maladie avez-vous eu recours au soin ?	1. Au stade pré ulcératif (nodule, œdème, plaque) 2. 2. Au stade ulcératif (plaie)	/__/	
Q60 7	A-t-il été guéri ?	1. Oui 2. Non	/__/	
Q60 8	Cependant, quel système de soins contre l'ulcère de buruli est privilégié dans votre village?	1. Centre de santé/ centre de prise 2. Tradipraticien 3. Auto médication (traditionnelle) 4. Auto médication (gélules) 5. Ne sais pas	/__/	

SECTION VII : PERCEPTION DU CENTRE DE PRISE EN CHARGE

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q70 1	Connaissez-vous un centre spécialisé dans le traitement de	1. Oui 2. Non	/__/	Si non, Q708

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
	l'ulcère de buruli ?			
Q70 2	De quel centre s'agit-il ?	1. Le centre de Taabo 2. Le centre de Djékanou 3. Le centre de Zoukougbeu 4. Autre.....	/__/	
Q70 3	Quelle est la distance entre votre village et le centre de prise en charge ?	/__/_/_/_/_/km	/__/_/_/_/_/	
Q70 4	Comment évaluez-vous cette distance par rapport à votre village ?	1. Très éloignée 2. Eloignée 3. Proche 4. Très proche	/__/	
Q70 5	Le centre de prise en charge est-il facile d'accès ?	1. Oui 2. Non	/__/	Si oui, allez à Q707
Q70 6	Si non, raison principale?	1. Route impraticable 2. Distance trop longue 3. Indisponibilité du personnel soignant 4. Mépris du personnel 5. Autre.....	/__/	
Q70 7	Quels sont les services que rend le centre aux malades ?	A.Diagnostic maladie 1. Oui 2. Non B.Hospitalisation 1. Oui 2. Non C.Sensibilisation 1. Oui 2. Non D.Soutien alimentaire1. Oui 2. Non E.Hébergement accompagnants 1. Oui 2. Non	/__/ /__/ /__/ /__/ /__/	

	QUESTIONS	MODALITÉS	RÉPONSES	SAUTS
Q70 8	Selon vous, peut-on guérir de l'ulcère de Buruli par les soins modernes?	1. Oui 2. Non	/__/	Si oui, allez à Q710
Q70 9	Si non, pourquoi ?	1. Remèdes modernes non efficaces 2. Maladie due à un sort 3. Remèdes traditionnels plus efficaces 4. Autre.....	/__/	
Q71 0	Comment trouvez-vous le coût du traitement de l'ulcère de Buruli au centre de prise en charge ?	1. Accessible 2. Non accessible 3. Autre.....	/__/	

**PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE ET DU
PROJET**

Cette étude a fait l'objet d'une publication concernant l'identification des sources de contamination par les mycobactéries non tuberculeuses au sein des populations de petits mammifères, comme mentionné ci-après :

- **Dassi C**, Mosi L, Akpatou B, Narh CA, Quaye C, Konan DO, Djaman JA and Bonfoh B. (2015). Detection of *Mycobacterium ulcerans* in *Mastomys natalensis* and Potential Transmission in *Buruli ulcer* Endemic Areas in Côte d'Ivoire. *Mycobact Dis* 5: 184. doi:10.4172/2161-1068.1000184

L'étude moléculaire menée au Ghana dans le cadre du projet global a également été l'objet d'une publication scientifique à savoir :

- Narh CA, Mosi L, Quaye C, **Dassi C**, Konan DO, Tay SCK, de Souza DK, Boakye DA and Bonfoh B. (2015) Source Tracking *Mycobacterium ulcerans* Infections in the Ashanti Region, Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1): e0003437. doi:10.1371/journal.pntd.0003437

Par ailleurs, un autre manuscrit scientifique est en préparation en vue d'une prochaine publication concernant l'identification des isolats de mycobactéries non tuberculeuses au sein des populations humaines et des sources environnementales aquatiques au sein des localités d'étude en Côte d'Ivoire.

- **Dassi C**, Mosi L, Narh CA, Quaye C, Konan DO, Djaman JA and Bonfoh B. (2016). Distribution and risk of non-tuberculous mycobacteria transmission within *Buruli ulcer* endemic areas in Côte d'Ivoire (en cours de soumission à *Ecohealth*)

ARTICLE 1

Publié à *Mycobacterial Diseases*



Detection of *Mycobacterium ulcerans* in *Mastomys natalensis* and Potential Transmission in Buruli ulcer Endemic Areas in Côte d'Ivoire

Christelle Dassi^{1,2}, Lydia Mosi^{2,3*}, Bertin Akpatou^{1,2}, Charles A. Nani^{2,4}, Charles Quaye^{2,4}, Danièle O. Konan², Joseph A. Djaman¹ and Bassirou Bonfoh²

¹UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan (UFRB), Côte d'Ivoire

²Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS), Adopodoumé, Côte d'Ivoire

³Biochemistry, Cell and Molecular Biology Department, University of Ghana, Legon, Ghana

⁴Parasitology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR), Legon, Ghana

*Corresponding author: Lydia Mosi, Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, Adopodoumé, Côte d'Ivoire, Tel. +233 54 0890352, E-mail: lmosi@csg.edu.gh, lmosi@hotmail.com

Received date: April 15, 2015; Accepted date: May 21, 2015; Published date: May 28, 2015

Copyright: ©2015 Dassi C. 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.

Abstract

The endemicity of Buruli ulcer (BU), a non-tuberculous mycobacteria infection, has significantly increased in Côte d'Ivoire. The exact transmission mode remains unknown but DNA based evidence of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent, have implicated potential environmental reservoirs, similar to those suspected in the transmission to humans. The role of small mammals in transmission has recently received some research attention. Based on the hypothesis that the overlapping ecology of human and animal habitats would favour mycobacteria transmission, the study aimed to identify BU like infections in small mammals living in close proximity to humans, in endemic communities. One hundred and eleven animals were trapped within five communities in two major endemic areas, Daloa and Tabbo. Majority of trapped small mammals were mice, *Mastomys natalensis*, of which 8 animals had external lesions. PCR on organ and lesion samples identified, predominantly, mycobacterium spp. of which five mice were positive for IS2404. IS2404 sequencing confirmed infection in two mice as *M. ulcerans* strain Agy99. Our findings suggest that small terrestrial mammals could be susceptible to mycobacteria, particularly, *M. ulcerans*, within endemic communities in Côte d'Ivoire. It also consolidates earlier evidence asserting their role as potential environmental reservoirs of *M. ulcerans* in endemic communities. The potential public health threat from these small mammals warrants an "OneHealth" approach to investigating the ecology and transmission of *M. ulcerans* in endemic countries.

Keywords: Non-tuberculous mycobacteria; Small mammals; Transmission; Reservoirs; Buruli ulcer

Introduction

Mycobacterium ulcerans (MU) is the causative agent of Buruli ulcer (BU), a severe necrotizing skin infection, occurring in tropical and subtropical regions of the world. It is the third most common mycobacterial disease after leprosy and tuberculosis [1]. *M. ulcerans* is environmental like most non-tuberculous mycobacteria (NTM), which are ubiquitous opportunistic pathogens causing infections in both humans and animals [2]. Although transmission of BU is still unknown, a few hypotheses have been proposed [3,4]. BU is a serious public health problem in developing countries including Benin [1], Côte d'Ivoire [5,6] and Ghana [7,8] where several new cases have been reported in rural areas since 1980. Much of research efforts have focused on risk factors associated with environmental habitat of the pathogen. A case-control study in 3 BU endemic districts in Ghana associated the disease with water bodies [9]. Using variable number tandem repeat (VNTR) typing, a recent study in Ghana showed that BU patients could be infected from MU-contaminated water bodies [10]. Similarly, a study conducted in three BU endemic communities in Côte d'Ivoire associated water bodies used by rural populations to MU infection [11].

Ecological and molecular data, further, suggest contaminated water, soil, detritus and a variety of organisms including protozoans, fish,

aquatic insects, mosquitoes, crustaceans, snails and wild amphibians as sources and/or reservoirs of *M. ulcerans* [12-20].

Mammals, especially rodents, living in close proximity to humans have been also implicated as potential reservoirs and/or hosts for mycobacteria, particularly *M. ulcerans* [21-23]. Indeed, the possible role of rodents in the ecology of *M. ulcerans* was also considered over 30 years ago in Uganda (East Africa), where researchers attempted but were unsuccessful to culture *M. ulcerans* from rodents collected in a BU endemic area [24]. Separately, studies in Australia observed skin ulcers on koalas, which were later isolated and confirmed as *M. ulcerans* and *M. scrofulaceum* [25,26]. Recent findings in the same country showed high concentrations of *M. ulcerans* DNA in possum faeces [23]. In West Africa, rodents and some insectivores like shrews may carry pathogenic mycobacteria [21] and this has been proven in experimental infections in animal models [27-30].

A study conducted in Benin detected different mycobacteria, but not *M. ulcerans*, in small mammals collected in BU endemic communities. The authors advocated for more research on small terrestrial mammals [22].

The reservoirs and source of transmission to humans remains unclear and whether small mammals have a role in transmission is an important question, which has received little attention. To address this question, surveys of small mammals are urgently required in BU endemic areas. The cases of natural infections reported in wild and domesticated animals (koalas, possums and an alpaca) in Australia,

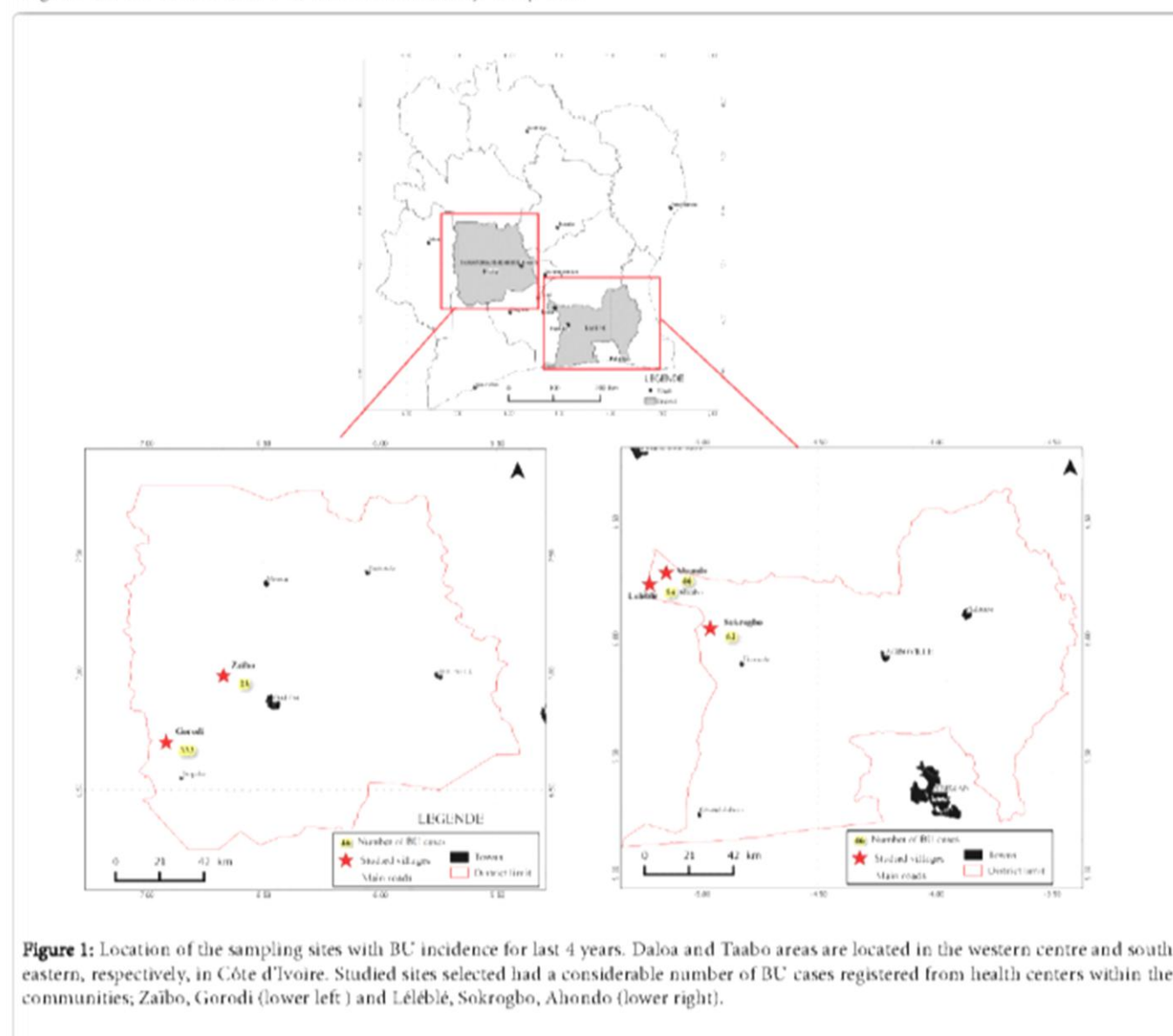
suggest that BU may cause lesions clinically identical to those observed in humans. Both humans and animals are probably infected through contact with environmental sources of *M. ulcerans* [31]. To extend findings from studies in Ghana [10], suggesting that transmission of MU depends on the overlap between human and environmental habitat of the pathogen, we aimed to identify BU like infections in small mammals which lived in close proximity to human environments, including homes and water bodies used by the communities in endemic areas. We present data, both clinical and molecular evidence, suggesting that small mammals may be susceptible to *M. ulcerans* infections and may be acting as reservoirs.

Materials and Methods

Study communities and animal collection sites

Study sites were selected based on data provided by the National Program for BU control (PNLCB) and BU endemicity. They were

located in two major BU endemic areas in Côte d'Ivoire with characteristic aquatic ecosystems (Figure 1). The first area, Daloa (Haut-Sassandra District), is located in the western centre, 406 km from Abidjan, the economic capital. This area is covered largely with forest and has the Sassandra River tributaries, which are used for agriculture irrigation and fishing activities. Gorodi and Zaïbo were the two selected rural communities. The second area, Taabo (Tiassalé Department), is located in the south eastern, 160 km from Abidjan. This area has three communities, Sokrogbo, Léléblé and Ahondo, with reported high BU incidences. Also, peculiar to this second area were the different environmental modifications, attached to Bandama River, including the hydroelectric dam construction, displaced populations with attached socio-economic activities.



Social and demographic characteristics of the population as well as contact rates of the community members with various animal types and aquatic environments were estimated by the use of structured questionnaires.

Questionnaire administration

Five hundred questionnaires were administered in the study communities. The questionnaires inquired mainly the demographic characteristics of the community inhabitants, main occupations of households, common diseases, knowledge of BU, contact with animals (types, raised and captured), and the prevention and treatment of *Buruli ulcer*. Communities were stratified into subsets based on population and reported cases of BU. Questionnaires were mainly administered to a member of the household in the French language. Local languages were used only to verify unclear responses using the help of a trained local community aid.

Small mammals trapping, identification and specimen preservation

Small mammals were investigated simultaneously in two different habitat types at each site (water bodies usually used by the communities and within the villages, precisely in houses). Animal trapping was done in the communities following standard live-trapping techniques [32] and protocol described by Narh et al. [10]. Examination for suspected lesion and organ harvesting were performed as described elsewhere [10,22]. For each animal, sample specimen were collected and labelled individually.

DNA extraction, gel-based PCR and sequencing analysis

Prior to laboratory analysis animal samples were processed in a Biosafety hood (CYTAIR Equipements Scientifiques & Industriels S.A.) following the protocols described elsewhere [10,22]. Total genomic DNA was extracted from lesion and organ specimen of the eight small rodents following the protocol described by Williamson et al. [19]. DNA extracts were screened for *Mycobacterium* sp. by PCR, which included negative and positive controls. All PCR reactions were performed in a A206 gradient thermal cycler (LonGene). Samples were initially screened for bacteria species using the 16S primer as described by Narh et al. Then, 16S positive samples were tested for the presence of bacteria which harbour the IS2404 insertion sequence using IS2404-PCR. Subsequently, positive samples from the latter were tested for the presence of pMUM001 using ER-PCR [10]. Sequencing of 16S and IS2404 PCR products was performed using the forward primers as described elsewhere [10]. Sanger sequencing was performed by MacroGen Inc (Netherlands).

Data analysis

Data was recorded and stored in Microsoft Excel. The mean trapping success in all selected sites was calculated and compared. Sequences were aligned using NCBI BLAST [33].

Results

Human activities related to animal

Of the 500 questionnaires, 288 (57.6%) were administered to males and 212 (42.4%) to females. Ages of respondents were ranged from 18 to 98 years old. The proportions of respondents involved in animal

related-economic activities are shown in Figure 2. A higher proportion of respondents hunted for animals in the wild compared to those having domestic animals. Mostly animals hunted were rodents (85% for grass-cutters and 72% for rats).

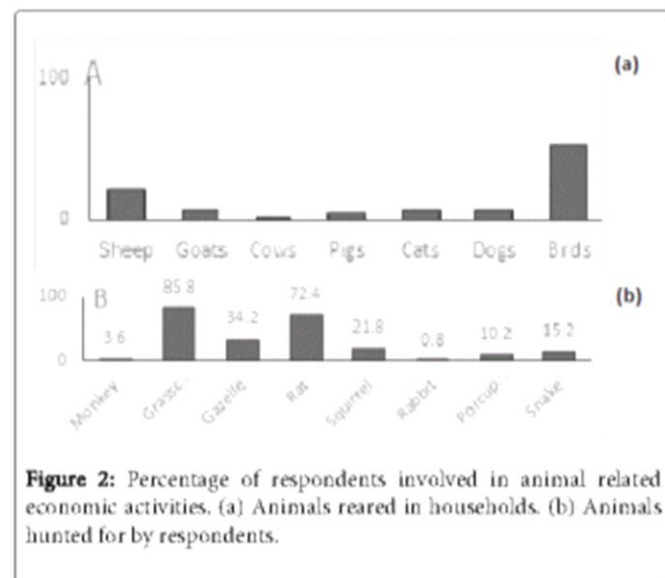


Figure 2: Percentage of respondents involved in animal related economic activities. (a) Animals reared in households. (b) Animals hunted for by respondents.

Trapping effort and traps success

After performing animal capture during two nights, a total of 111 animals were caught representing 11.46% of capture success (Table 1).

Community	Trapping effort			Trapping success	Performance (%)
	Night 1	Night 2	Total		
Zaibo	100	99	199	11	5.53
Gorodi	100	90	190	34	17.89
Lélébié	100	90	190	31	16.32
Sokrogbo	100	100	200	14	7
Ahondo	95	95	190	21	11.05
Total	495	474	969	111	11.46

Table 1: Relative density of small mammals captured in BU endemic areas in Côte d'Ivoire.

Small rodent community analysis

The diversity of small mammals caught in the 5 communities is summarised below (Table 2). Different species of small rodents were identified among those trapped including *Mastomys natalensis* (74.78%), *Cricetulus* sp. (11.71%), *Rattus* sp. (9.01%), *Mus musculoides* (1.80%), *Prionomys rostratus* (1.80%) and *Iophuromys sikapusi* (0.90%). The majority of animals trapped were *Mastomys natalensis*.

Distribution and data of animal presenting external lesions within communities

The proportion of small rodents observed with external lesions were 7.2% (N=111) (Table 3). Animals presented lesions were identified as *Mastomys natalensis* (Table 4) and lesions were observed on the tail, hind foot, foot, abdomen, lateral side and bottom. Identical numbers of animals observed with lesions were found for both female and male rodents. At least, one small rodent with lesion was present in each study community and all were of adult age. They were trapped within the community (homes).

Species	Number	Percentage (%)
<i>Mastomys natalensis</i>	83	74.78
<i>Cricetulus olivieri</i>	9	8.11
<i>Cricetulus poensis</i>	4	3.60
<i>Rattus rattus</i>	9	8.11
<i>Rattus norvegicus</i>	1	0.90
<i>Mus musculoides</i>	2	1.80

<i>Prionomys rostratus</i>	2	1.80
<i>Lophuromys sikapusi</i>	1	0.90
Total	111	100

Table 2: Diversity of capture within small rodents community.

Community	No external lesions	External lesions
Zaibo	10	1
Gorodi	32	2
Léléblé	30	1
Sokrogbo	11	3
Ahondo	20	1
Total	103	8

Table 3: Distribution of small rodents with external lesions per community.

Area	Community	Trap Location	Animal Code	Species	Sex/Age	Lesion location	Sample specimen
Daloa	Zaibo (Niessoko)	House	ZN1	<i>Mastomys natalensis</i>	Female Adult	Not specified	Lesion biopsy
							Lesion swab
	Gorodi (Ponagbeu)	House	GP3a	<i>Mastomys natalensis</i>	Female Adult	Tail	Lesion biopsy
							Lesion biopsy
Taabo	Léléblé (Djandjiko)	House	LD3a	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adult	Foot	Lesion biopsy
							Lesion swab
	Sokrogbo (Troko)	House	ST1	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adult	Abdomen	Lesion biopsy
							Lesion swab
	Sokrogbo (Kpala)	House	SK3a	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adult	Lateral side	Lesion biopsy
							Lesion swab
	Sokrogbo (Kpala)	House	SK3b	<i>Mastomys natalensis</i>	Female Adult	Foot (swelling)	Fine aspiration needle
							Lesion biopsy
	Ahondo (Awlobo 1)	House	AA1-2a	<i>Mastomys natalensis</i>	Male Adult	Bottom	Lesion swab

Table 4: Data of small rodents with external lesions.

Detection of *Mycobacteria/M. ulcerans* in animals presenting external lesions

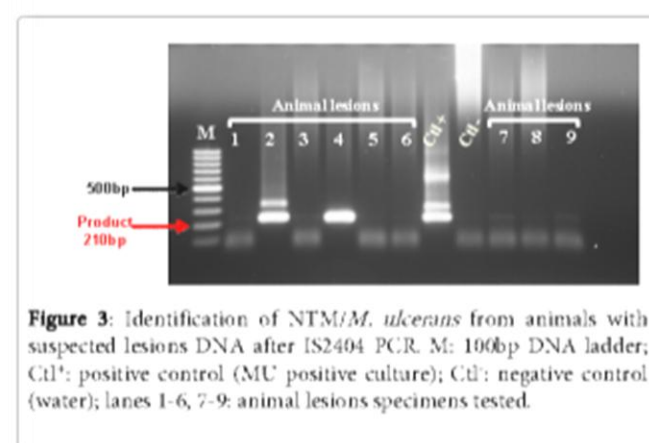
PCR analysis of 16S rRNA and IS2404 markers for lesion samples detected bacteria DNA in 5 mice (Figure 3).

The amplification of enoyl reductase (ER) marker from lesion did not show any positivity for the protocol we used. Besides that, 16S rRNA positivity was observed for some organs harvested from the animals with lesions (Table 5).

Animal Code	Lesion site	IS2404 lesion positivity	ER positivity	lesion	16S rRNA lesion and organ positivity	Organism (% Sequence Identity)
GP3a	Tail	LB	none		LB, SP, KI, LI, LU, STO, AS, SI, CS, HT	LB, <i>M. ulcerans</i> Agy99 (98%)
GP6	Hind foot	LB, LS	none		LB, LS, SP, KI, LI, LU, STO, AS, HT	LB, <i>Corynebacterium kutscheri</i> strain MYL-3 (86%) LS, <i>Arthrobacter</i> spp (75%)
ST1	Abdomen	LB	none		LB, SP, KI, LI, LU, STO, AS, CS, HT	LB, <i>Corynebacterium kutscheri</i> strain MYL-3 (99%)
SK3b	Foot	Pus FNA	none		FNA, SP, KI, LI, LU, AS, HT	FNA, <i>M. ulcerans</i> Agy99 (94%)
AA1-2a	Bottom	LS	none		LS, SP, KI, LI, STO, AS, CS	LS, <i>Corynebacterium kutscheri</i> strain MYL-3 (98%)

SP: Spleen, KI: Kidney, LI: Liver, LU: Lung, STO: Stomach, AS: Anal Swab, SI: Small Intestine, CS: Caecum, HT: Heart, LB: Lesion Biopsy, LS: Lesion Swab, FNA: Fine Needle Aspiration.

Table 5: Data of small rodents with external lesions tested positive for bacteria/NTM.



Sequence analysis of the amplified 16S rRNA and IS2404 from the lesion samples confirmed bacteria as shown previously. *Corynebacterium kutscheri* strain MYL-3 was detected in 3 lesions on hind foot, abdomen and bottom sites respectively for animals with GP6, ST1 and AA1-2a test codes. *Arthrobacter* spp. was also identified in a lesion infected by *Corynebacterium kutscheri* strain MYL-3 (GP6 animal test code); the sequence matching with *Arthrobacter* spp. S14 partial 16S rRNA gene, suggesting co-infection. Furthermore, 2 lesions sampled on the tail (GP3a) and foot (SK3b) (Figure 4) were confirmed as *M. ulcerans*. The IS2404 sequence from these two animal lesions collected from Gorodi (Daloa) and Sokrogbo (Taabo) showed 98% and 94% sequence identity to *M. ulcerans* Agy99 (Accession N° CP000325.1, GenBank).

Discussion

Our data presents *M. ulcerans* infection in the African small rodent *Mastomys natalensis*. These rodents were trapped from Gorodi (Daloa) and Sokrogbo (Taabo), two BU endemic communities in the western centre and south-eastern of Côte d'Ivoire. The majority of animal trapped within the study sites were *Mastomys natalensis*. This species is widespread and common in Sub-Saharan Africa. It may be a

natural carrier of non-human pathogens due to its semi-commensal habit and specific factors as its high propagation rate [34].



After 16S rRNA and IS2404 PCR positivity, IS2404 sequencing showed 98% and 94% identity to *M. ulcerans* strain Agy99 for two lesions specimens on tail and foot. Besides that, 16S rRNA sequencing of suspected lesions confirmed presence of other bacterial strains like *Corynebacterium kutscheri* and *Arthrobacter* spp. The detection of bacterial infections in small mammals in this study, particularly mycobacterial infections, reflects previous findings [21,22,35]. Indeed, studies conducted in Benin in order to identify reservoirs for *M. ulcerans* in terrestrial mammals have shown the presence of other mycobacteria in African rodents and insectivores [21] and more particularly different mycobacteria were detected in small mammals within endemic areas for BU [22]. In this setting, although earlier studies conducted in a BU endemic village (Ananekrom) in the Ghana Ashanti Region failed to detect *M. ulcerans* in the organs or faeces of rodents and shrews, the hypothesis that these small terrestrial mammals may be part of the reservoir of *M. ulcerans* was not rejected [35].

As shown previously, small mammals in BU endemic areas could also present external lesions similar to those observed in humans. This suggests common sources of infection, the environment [10]. Additionally, experimental trials with grasscutters also revealed that

this small rodents developed lesions characteristic of BU when infected with *M. ulcerans* [27]. In Australia, other terrestrial mammals were implicated in BU transmission; *M. ulcerans* DNA was detected in the faeces of possum leaving in BU endemic sites [23]. These emphasize the major role of small mammals in the ecology and transmission of *M. ulcerans*.

Durnez et al. [21] did not observed *M. ulcerans* DNA in the organs of *Rattus rattus* trapped in Benin. An Australian study suggested that the rodents could be infected with *M. ulcerans* from direct environment shared with other animal species susceptible to *M. ulcerans*, a similar source of *M. ulcerans* could be absent in Benin [21]. In the same way, Fyfe et al proposed that infected mammals may ingest *M. ulcerans* from the environment or get infected by an insect vector [23].

Thus, transmission to humans may occur via these vectors or from direct contact with contaminated environment. These findings strengthen the hypotheses that both humans and animals could probably be infected through contact with environmental sources of *M. ulcerans* [31]. Thereby, regarding the possible role of small mammals in the dissemination of *M. ulcerans*, the mode of contamination from environment to humans could be linked to overlapping and sharing of ecological habitats. Several field observations during the study and data gotten from questionnaire, suggest that inhabitants' lifestyle, activities and socio cultural behaviours may be risk factors for MU infection; then the detection of *M. ulcerans* in these rodents may enhance these risk factors. One more point may be to determine if as in a disease reservoir, the pathogen could be permanently maintained and if infection could be transmitted from them to target population (other vector, human) [36]. Regarding the few number of animals presented BU-like lesions observed, trapping effort should be increase within our studies communities. The harvested organs collected from animal which did not present lesions should also be processed for mycobacterial screening as proceed for the ones with lesions. Investigations for potential environmental reservoirs of *M. ulcerans* within small mammals should also be done in other endemic communities in Côte d'Ivoire.

Conclusion

In light of our findings, the role of small terrestrial mammals as potential environmental reservoirs for *M. ulcerans* in sub-Saharan Africa, particularly in West African communities, should not be neglected. The model of 'One Health' concept which has been used in this study highlights the importance to consider an approach taking into account human, animal and environment they share, to understand manage and prevent disease transmission. As suggested by previous studies, the precise role of small mammals particularly rodents in BU transmission has to be clarified in order to develop efficient strategies for BU outbreaks, control and prevention.

Acknowledgement

We thank the populations in communities for their assistance with the field work and CSRS molecular biology laboratory staff for assistance with molecular work. The authors acknowledge support from the consortium Afrique One "Ecosystem and Population Health: Expanding Frontiers in Health". Afrique One is funded by the Wellcome Trust (WT087535MA). The authors also acknowledge the training support of the West Africa Centre for Cell Biology of

Infectious Pathogens at the Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology, University of Ghana, Legon.

References

- Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, et al. (2004) *Mycobacterium ulcerans* disease: role of age and gender in incidence and morbidity. *Trop Med Int Health* 9: 1297-1304.
- Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, et al. (1997) Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. *Appl Environ Microbiol* 63: 4135-4138.
- Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK (1974) Human *Mycobacterium ulcerans* infections developing at sites of trauma to skin. *Am J Trop Med Hyg* 23: 919-923.
- Wansbrough-Jones M, Phillips R (2006) Buruli ulcer: emerging from obscurity. *Lancet* 367: 1849-1858.
- Daric HJ, Le Guyader T, Touze JE (1993) [Epidemiological and clinical aspects of Buruli ulcer in Ivory Coast. 124 recent cases]. *Bull Soc Pathol Exot* 86: 272-276.
- Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh CR Jr, Diomande I, Saki MZ, et al. (1995) Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 52: 219-224.
- van der Werf TS, van der Graaf WT, Groothuis DG, Knell AJ (1989) *Mycobacterium ulcerans* infection in Ashanti region, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 410-413.
- Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, Okrah J, Asamoah K, et al. (2002) Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. *Emerg Infect Dis* 8: 167-170.
- Raghuathan PL, Whitney EA, Asamoah K, Stienstra Y, Taylor TH Jr, et al. (2005) Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* infection): results from a case-control study in Ghana. *Clin Infect Dis* 40: 1445-1453.
- Narh CA, Mosi L, Quaye C, Dassi C, Konan DO, et al. (2015) Source tracking *Mycobacterium ulcerans* infections in the Ashanti region, Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003437.
- Ahoua L, Aka N, Ekaza E, Bouzid S, N'Guessan R, et al. (2009) Risk factors for Buruli ulcer in Côte d'Ivoire: Results of a case-control study, August 2001. *Afr J Biotechnol* 8: 536-546.
- Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 353: 986.
- Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint André JP, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 68: 4623-4628.
- Marsollier L, Séverin T, Aubry J, Merritt RW, Saint André JP, et al. (2004) Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 70: 6296-6298.
- Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, De Weert D, Bankye D, et al. (2004) Potential role for fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): an environmental study. *Appl Environ Microbiol* 70: 5679-5681.
- Johnson PD, 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.
- Doannio J, Konan K, Dosso F, Kone A, Konan Y, et al. (2011) *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. *Médecine tropicale* 71: 53-57.
- Kotlowski R, Martin A, Ablordey A, Chemlal K, Fonteyne PA, et al. (2004) One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish. *J Med Microbiol* 53: 927-933.
- 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.
20. Wilson SJ, Kaufman MG, Merritt RW, Williamson HR, Malakauskas DM, et al. (2013) Fish and amphibians as potential reservoirs of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer disease. *Infect Ecol Epidemiol* 3.
21. Durnez L, Eddyani M, Mgode GF, Katakweba A, Katholi CR, et al. (2008) First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Appl Environ Microbiol* 74: 768-773.
22. Durnez L, Suykerbuyk P, Nicolas V, Barrière P, Verheyen E, et al. (2010) Terrestrial small mammals as reservoirs of *Mycobacterium ulcerans* in benin. *Appl Environ Microbiol* 76: 4574-4577.
23. Fyfe JA, 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.
24. Revill W, Morrow R, Parson W, Kiryabwire J (1972) *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). In Shaper AG, Kibukamusoke JW, Hutt MSR (eds) *Medicine in a tropical environment* British Medical Association, London, England, pp. 19-31.
25. Mitchell PJ, Jerrett IV, Slee KJ (1984) Skin ulcers caused by *Mycobacterium ulcerans* in koalas near Cairns, Australia. *Pathology* 16: 256-260.
26. Mitchell PJ, McOrist S, Binney R (1987) Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection in koalas (*Phascolarctos cinereus*) on Raymond Island, southeastern Australia. *J Wildl Dis* 23: 386-390.
27. Addo P, Adu-Addai B, Quartey M, Abbas M, Okang I, et al. (2007) Clinical and histopathological presentation of Buruli ulcer in experimentally infected grasscutters (*Thryonomys swinderianus*). *Internet J Trop Med* 3: e2.
28. Clancy JK (1964) Mycobacterial Skin Ulcers In Uganda: Description Of A New Mycobacterium (*Mycobacterium Buruli*). *J Pathol Bacteriol* 88: 175-187.
29. MacCallum P, Talhurst JC, et al. (1948) A new mycobacterial infection in man. *J Pathol Bacteriol* 60: 93-122.
30. Singh NB, Srivastava A, Verma VK, Kumar A, Gupta SK (1984) *Mastomys natalensis*: a new animal model for *Mycobacterium ulcerans* research. *Indian J Exp Biol* 22: 393-394.
31. Portals F, Chemlal K, Elsen P, Johnson PD, Hayman JA, et al. (2001) *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. *Rev Sci Tech* 20: 252-264.
32. Rodgers A, Hutchison C, and Simpson M (2008) *Methods for Sampling Small Mammals and their Habitats in Boreal Mixedwoods*. CNFR Technical Report TR-001 Ontario Ministry of Natural Resources, Centre for Northern Forest Ecosystem Research, Thunder Bay, Ontario, Canada, p. 15.
33. Altschul SE, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
34. Coetzee CG (1975) The biology, behaviour, and ecology of *Mastomys natalensis* in southern Africa. *Bull World Health Organ* 52: 637-644.
35. Vandellanno K, Durnez L, Amisshah D, Gryseels S, Daddo A, et al. (2010) Application of real-time PCR in Ghana, a Buruli ulcer-endemic country, confirms the presence of *Mycobacterium ulcerans* in the environment. *FEMS Microbiol Lett* 304: 191-194.
36. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK (2002) Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 8: 1468-1473.

ARTICLE 2

Publié à *PLos Neglected Tropical Diseases*

RESEARCH ARTICLE

Source Tracking *Mycobacterium ulcerans* Infections in the Ashanti Region, Ghana

Charles A. Narh^{1,2,3}, Lydia Mosi^{2,4*}, Charles Quaye^{1,2}, Christelle Dassi², Daniele O. Konan², Samuel C. K. Tay³, Dziedzom K. de Souza¹, Daniel A. Boakye¹, Bassirou Bontoh²

1 Parasitology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Legon, Ghana, **2** Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, Adopodume, Côte d'Ivoire, **3** Clinical Microbiology Department, School of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, **4** Biochemistry, Cell and Molecular Biology Department, University of Ghana, Legon, Ghana

* lmosi@ug.edu.gh



OPEN ACCESS

Citation: Narh CA, Mosi L, Quaye C, Dassi C, Konan DO, Tay SCK, et al. (2015) Source Tracking *Mycobacterium ulcerans* Infections in the Ashanti Region, Ghana. PLoS Negl Trop Dis 9(1): e0003437. doi:10.1371/journal.pntd.0003437

Editor: Gerd Pluschke, Swiss Tropical and Public Health Institute, SWITZERLAND

Received: May 20, 2014

Accepted: November 25, 2014

Published: January 22, 2015

Copyright: © 2015 Narh et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors acknowledge support from the consortium Afrique One "Ecosystem and Population Health: Expanding Frontiers in Health". Afrique One is funded by the Wellcome Trust (WT087535MA). CAN was also supported by CODESRIA's Small Grant for Thesis Writing (Ref SGRT.47/T.12). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Although several studies have associated *Mycobacterium ulcerans* (MU) infection, Buruli ulcer (BU), with slow moving water bodies, there is still no definite mode of transmission. Ecological and transmission studies suggest Variable Number Tandem Repeat (VNTR) typing as a useful tool to differentiate MU strains from other Mycolactone Producing Mycobacteria (MPM). Deciphering the genetic relatedness of clinical and environmental isolates is seminal to determining reservoirs, vectors and transmission routes. In this study, we attempted to source-track MU infections to specific water bodies by matching VNTR profiles of MU in human samples to those in the environment. Environmental samples were collected from 10 water bodies in four BU endemic communities in the Ashanti region, Ghana. Four VNTR loci in MU Agy99 genome, were used to genotype environmental MU ecovars, and those from 14 confirmed BU patients within the same study area. Length polymorphism was confirmed with sequencing. MU was present in the 3 different types of water bodies, but significantly higher in biofilm samples. Four MU genotypes, designated W, X, Y and Z, were typed in both human and environmental samples. Other reported genotypes were only found in water bodies. Animal trapping identified 1 mouse with lesion characteristic of BU, which was confirmed as MU infection. Our findings suggest that patients may have been infected from community associated water bodies. Further, we present evidence that small mammals within endemic communities could be susceptible to MU infections. *M. ulcerans* transmission could involve several routes where humans have contact with risk environments, which may be further compounded by water bodies acting as vehicles for disseminating strains.

Author Summary

Buruli ulcer is a skin disease, which is endemic in over thirty countries, mostly in West Africa, with affected populations being largely rural. The causative organism, *Mycobacterium*

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

ulcerans (MU), is an environmental mycobacterium and although transmission is unclear, frequent exposure to these MU-contaminated environments have been suggested as risk factors. We conducted this study on the premise that if patients are infected from MU-contaminated water bodies, then the genotype of MU strains in these patients should be identical to those in their community associated water bodies and wetlands. Using Variable Number Tandem Repeat (VNTR) as a genetic tool, we determined the genotypes of MU from both water bodies and patient samples. Comparison and overlap of these genotypes, within each community, suggest that patients were possibly infected from at least one water body. Additionally, we present evidence that small mammals within endemic communities could be susceptible to MU infections and may be acting as reservoirs. Our findings suggest that future ecological and molecular studies in the hope of elucidating a definite transmission route, should focus on source-tracking MU infections to community associated risk environments while employing a OneHealth approach in the process.

Introduction

Buruli ulcer (BU) is a necrotizing skin disease which has been reported in over thirty countries. The most endemic countries include Ghana, Togo, Cote d'Ivoire and Benin with affected populations significantly being rural [1]. *Mycobacterium ulcerans* (MU), the causative agent of BU is an environmental mycobacteria. The mode of transmission to humans is still not clear although a few hypotheses have been advanced and tested [2–4]. Relying on advances in environmental microbiology and genotyping tools to identify habitats and reservoirs of *M. ulcerans* persistence and proliferation could aid in such transmission studies [5, 6]. Human-to-human transmission is rare [7] and infection seems to be high among people with frequent contact to slow moving water bodies or wet lands, in endemic communities [5, 8]. Within an aquatic environment, *M. ulcerans* can be found at the air-water interface, form biofilm on surfaces and probably occupy microhabitats not directly exposed to light but aerated [9]. From these biotopes, it is possible for the bacteria to infect susceptible hosts [10]. The viability of MU from environmental sources was proven with successful cultivation of the bacterium from an aquatic insect and subsequent establishment of infection in a mouse model [11]. Additionally, molecular data have correlated abundance of MU DNA from these environments with increasing BU cases [5]. We posit that patients are infected from MU-contaminated water bodies, hence MU genotypes from both sources should be identical. Earlier efforts have focused on comparing and differentiating human isolates within and from different geographical origins leaving out the environmental component [12–14].

An emerging development on the transmission of MU is the role small mammals could be playing in the ecology of the pathogen. *M. ulcerans* infection with clinical presentations similar to those in humans have been observed in koalas [15], possums [16, 17] and in armadillos [18], in studies conducted in Australia. A study conducted by Durnez *et al.* in Benin, where small mammals were trapped and analyzed for mycobacterial infections, detected several species of mycobacteria but not *M. ulcerans* [19]. Experimental studies in Ghana have also shown indigenous grasscutters, *Thryonomys swinderianus*, to be susceptible to *M. ulcerans* infection [20]. Small mammals, living in close proximity to humans and commonly hunted animals, like grasscutters, rabbits and rats could therefore be potential reservoirs of *M. ulcerans*.

Application of VNTR typing has revealed genetic differences among MU isolates collected from different patients and geographical regions [6, 14, 21–25]. Hlty *et al.* [14], identified three pathogenic MU genotypes in Ghana using this tool. Their findings were corroborated by

ecological studies, investigating the distribution of *M. ulcerans* in endemic and non-endemic communities in Ghana [6]. The addition of other polymorphic loci will therefore increase the discrimination power in differentiating intra-species variation.

Transmission of environmental mycobacteria is dependent on the overlapping habitats of the pathogen and humans [26]. Major overlap occurs in water where humans are exposed to mycobacteria through drinking, swimming, and bathing [26]. Thus, we source-tracked human MU infections to 10 water bodies, in four BU endemic communities, in Ghana. Using VNTR as an identifying tool, we uncovered additional genotypes and showed that patients were most likely infected from the water bodies they were frequently exposed to. We also assessed the role of small mammals as reservoirs of MU and suggest that they may be susceptible to MU infections and/or act as reservoirs. Using the 'OneHealth' concept, which seeks to define, manage and prevent diseases using a holistic approach of human, animal and environmental importance, we discussed a plausible transmission model, suggesting possible routes of MU infections from the environment.

Materials and Methods

Ethics statement

Ethical approval for patient recruitment into the study was sought and approved from the institutional review board of the Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR), University of Ghana, (FWA 00001824; IRB00001276; IORG0000908). This also covered the administration of questionnaires. All participants signed a written informed consent form before recruitment into the study. All suspected cases were confirmed by PCR and results sent back to the District Health Directorate for treatment to commence. Approval for animal trapping and collection was under the permit of the Ashanti Regional Ministry of Health and the Wildlife Division of the Forestry Commission of Ghana (FCWD/GH-02), following its guidelines on animal husbandry. Dissection and harvesting of animal organs was adapted from Duriez *et al.* [19].

Selected communities and water bodies

The study was carried out in Numereso, sub-district within the Amansie Central District of the Ashanti region, Ghana. The four selected communities for this study were Wromanso (N06.03256 W001.89761), Bepotenten (N06.09213 W001.96604), Monia-Gyaman (N06.05113 W001.92242) and Sukuumu (N06.05190 W001.94341). These communities were selected based on reported BU prevalence of 12.1, 7.8, 6.6 and 6.4 (per 1000 persons) for Bepotenten, Sukuumu, Monia-Gyaman and Wromanso respectively (Amanse District Health Directorate records). There was at least one working borehole with pump in each community, but inhabitants still used water from water bodies, for domestic and agricultural activities (S1 Table). We sought to identify among other things, livelihood strategies, hunting and animal rearing in households and perception on the modes of BU transmission, using a questionnaire we developed.

Environmental sampling

Environmental sampling followed procedures described by Williamson *et al.* [6] with slight modifications. Soil, water filtrands and detritus were collected in triplicates and biofilm in quintuplicates. A sterile scalpel was used to collect about 5g of soil from the water floor and two from the riparian zone 5m apart into a 15ml falcon tube (BD Biosciences). This was preserved in 96% ethanol (Pharmacos). Detritus consisted of dead leaves, stems and grass blades

within the water body. These were cut into a 15ml falcon tube and also preserved in 96% ethanol. Biofilm were taken from the surfaces of stems and leaves of dominant aquatic vegetation. Briefly, these parts were cut into Ziplock bags, 100ml of double distilled water was added, sealed and the biofilm material was dislodged by rubbing the bag vigorously several times. About 50ml of the resulting suspension was then poured out into a falcon tube for later analysis. For water filtrand, about 2L of water was scooped from the surface of the water body. Fifty milliliters of this was filtered through a 0.45µm nitrocellulose filter (Whatman Inc). The water was then pumped through until the built resistance could not be overcome. The nitrocellulose filter was then removed and wrapped completely in aluminum foil. All samples were kept cool and transported to the laboratory where they were preserved at 4°C until processing. All materials were washed and decontaminated with 70% bleach and, sterilized with 90% ethanol and DNA away (Molecular BioProducts) between sampling sites.

Sample collection from suspected BU patients

Active case searches were organized in the four communities and clinical samples taken from all suspected BU cases for confirmation and for the study. All participants signed a consent form before recruitment into the study. All suspected cases were confirmed by PCR and results sent back to the District Health Directorate for treatment to commence. Samples taken which were stored in a cooler included fine needle aspirates (FNA) for nodules and swabs for open lesions.

Small mammal trapping and dissection

Sherman livetraps (H.B. Sherman Traps, Inc.) were used in all small mammal collections. Traps, baited with a mixture of dried fish, groundnut paste and flour were set randomly in selected houses, farms and near water bodies. A total of 100 traps were set per community per night. Successful traps were labeled with the GPS coordinates of the site and all traps were washed with bleach between communities. Trapped animals were euthanized with chloroform and examined for external lesions and swellings before dissection. Organs including heart, lungs, liver, stomach, small intestines, caecum, kidneys, and spleen were harvested into separately labeled vials (2ml screw-cap tubes). Additionally, anal swabs, lesion swabs and tissue biopsies of lesions, if present, were taken. Animal carcasses were disinfected and buried 1.5ft below the ground. This paper presents data on the five animals with external lesions.

Sample processing for laboratory analyses

Biofilm samples were concentrated with an optimized protocol developed in the lab. Briefly, the 50ml falcon tubes containing the biofilm in suspension were spun at 12,000 rpm for 5 minutes in a High Speed Refrigerated Centrifuge (Suprema 21, TOMY) at 4°C. Twenty milliliters of the supernatant was carefully decanted off. This procedure was repeated at 13,000 and 14,000 rpm and each time discarding 5ml of the resulting supernatant. The remaining 10ml was preserved at 4°C until further use. All other environmental samples were processed as previously described [7]. FNAs and swabs from patient samples were processed for culture, microscopy, DNA extraction and PCR using protocols from other studies [6, 27, 28]. The samples were cultured in two ways. In one set, serial dilutions were performed, plated on LJ media slants and incubated at 32°C. In another set, samples were decontaminated using the Modified Petroff's method and plated on LJ media slants. Processing of animal samples was carried out in a biosafety cabinet (Clean Bench, Hitachi). About a half of each organ sample (entire biopsy was used) was homogenized on a glass slide using a scalpel. The homogenized tissue was then

scraped into a vial containing 1 ml of 1X PBS. The homogenate was then vortexed vigorously and 250 µl was used for extraction.

DNA extraction, PCR and sequence analyses

DNA extraction for human and animal samples were performed using the Qiagen Dneasy blood and tissue kit (QIAGEN) following the manufacturer's protocol. For environmental samples, DNA extraction followed the protocol described by Williamson *et al.* [6].

Negative and positive controls were included for each PCR run. Additionally, for environmental samples spiked samples (2.5 µl each of, positive control and an environmental extract) were included to check for inhibitions. Bovine Serum Albumin (Promega) was also added to environmental samples to relieve PCR inhibition in the amplification of all target loci. All PCR reactions were performed in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). All primer sequences used in this study are listed in S2 Table. To identify environmental mycobacteria, samples were first screened using mycobacterial 16S rRNA primer as previously described [29]. Samples were then screened for the insertion sequence *IS2404* PCR in a nested PCR, adapted from Abiordey *et al.* [30]. New primer sets were designed to amplify a 476bp product on the *MlsA* domain, encodes enoyl reductase (ER), of pMUM001 plasmid. This was performed in a 25 µl reaction containing 1X PCR buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 400 µM each of deoxyribonucleotide (Promega), 160 nM each of forward and reverse primers, 1 U GoTaq polymerase (Promega) and 5 µl of genomic DNA. Reaction was cycled at 95°C for 3 mins followed by 40 cycles each of, denaturation at 94°C for 30s, annealing at 63°C for 35s and extension at 72°C for 45s. Final extension was at 72°C for 10 mins and reaction held at 4°C.

PCR for VNTRs was adapted from Williamson *et al.* and Hilty *et al.* [5, 14] with slight modifications. Allelic profiles used were in the order: MIRU1, Locus 6, ST1, Locus 19. Briefly, thermal cycling for all four VNTR loci were increased by additional 5 cycles. Seven microliters (7 µl) of PCR products were run on a 2% agarose gel (Sigma-Aldrich), stained with ethidium bromide (Sigma-Aldrich) and band sizes were estimated with 100bp ladder. Repeat numbers for all VNTR loci were calculated based on published data [6, 14, 21, 23–25].

Representative amplicons of *IS2404*, ER, 16S and VNTRs were confirmed with sequencing. VNTR-profiling was performed for only *IS2404* positive samples and repeats confirmed with sequencing randomized samples. PCR products (40 µl), with varying repeat sizes for each locus, were sent for sequencing (Macrogen Inc, Netherlands). Multi sequence alignments (MSA) and phylogenetic analyses were performed within MEGA V5 [31]. Representative sequences for loci including *IS2404*, ER, MIRU1, ST1, Locus 6 and Locus 19 have been deposited in GenBank under the following accession numbers, KM459595, KM459596, KM459597, KM459598, KM459599, KM459600, KM459601, KM459602, KM459603 and KM459604.

Results

Profile of selected communities

Majority of the inhabitants in all four communities were farmers (S3 Table) but some youth were into small scale surface gold mining (galamsey) mainly along the Offin River (Fig. 1), which runs through all four communities. Preliminary analysis showed that although about 50% of inhabitants in a community used nearby surface water bodies for various purposes, swimming and bathing in these water bodies were the only activities (S1 Table) that were associated with an increased risk for BU infection (unpublished data). This informed our choice of specific water bodies to sample. In total, ten water bodies were selected after active case surveillance, where 2, 4, 1 and 7 cases were detected in Wromanso, Monia-Gyaman, Bepotenten and Sukuumu respectively.



Figure 1. Four water bodies that were sampled. A) Twingun 2 pond at Sukuumu; B) Illegal mining activities (galamsey) on the Offin River at Monia-Gyaman; C) Nkotia stream at Sukuumu; D) Bebonu pond at Wromanso.

doi:10.1371/journal.pntd.0003437.g001

Case confirmation

Both microscopy and culture were attempted for FNA and swabs. However, acid-fast bacilli were not detected. There was over growth of other bacteria in the set that was serially diluted but not decontaminated. No growth was observed in the decontaminated set. Case confirmation was therefore based only on PCR (Table 1).

Preliminary detection of MPMs in environmental samples

All environmental samples ($N = 140$) were first screened for *Mycobacterium* spp using the mycobacterial 16S rRNA primers. Positive samples were then tested for IS2404. Total sample positivity was 38/140 (27%) and 25/38 (66%) for 16S and IS2404 respectively (Table 2). The Offin River at Sukuumu had the highest positivity for *Mycobacterium* spp and MPMs. Of the 14 samples from this river, eight contained mycobacteria out of which 5 were confirmed as containing MPMs. Mycobacteria was not detected in all 14 samples from Mon-Offin. At least one sample from all type of water body; **River** (Suk-Offin, Wro-Offin and Bep-Oda), **Stream** (Mon-Nkotia, Mon-Ampoma and Suk-Nkotia) or **Pond** (Wro-Bebonu, Suk-Twingun1 and Suk-Twingun2) tested positive for IS2404 (Table 2). The Offin River flows close to all four communities, but could not be sampled at Bepotenten as it was inaccessible due to galamsey (illegal surface gold mining) activities at the time of sampling (Fig. 1). Highest positivity for 16S was observed with biofilm 22/50 (44%) with the lowest being detritus 2/30 (7%). Differences in matrix positivity was statistically significant ($P = 0.0007$) when tested with the Chi-square contingency table for independence (Table 2). AFB microscopy showed clumps of bacilli in biofilm samples as

Table 1. MU confirmation and VNTR profile of MU detected in human samples.

Amansie Central		Tests							Genotype
		Diagnosis			VNTR allelic profiles				
Communities	Test ID	16S	IS2404	ER	MIRU1	L 6	ST1	L 19	
Wromanso	FW1	Pos	Pos	Pos	1	2	2	2	Z
	FW2	Pos	Pos	Pos	1	2	2	1	Y
Monia-Gyaman	SM1	Pos	Pos	Pos	1	1	2	2	X
	SM2	Pos	Pos	Pos	1	1	2	1	W
	FM3	Pos	Pos	Pos	1	2	2	1	Y
	FM4	Pos	Pos	Pos	1	1	2	2	X
Bepotenten	FB1	Pos	Pos	Pos	1	2	2	1	Y
	FB2	Neg	Neg	Neg					
Sukuumu	FS1	Pos	Pos	Pos	1	1	2	2	X
	FS2	Pos	Pos	Pos	1	2	2	1	Y
	FS3	Pos	Pos	Pos	1	1	2	0	UA
	FS4	Pos	Pos	Pos	1	2	2	2	Z
	FS5	Pos	Pos	Pos	1	1	2	2	X
					1	1	2	1	W
	FS6	Pos	Pos	Pos	1	1	2	0	UA
	FY1	Pos	Pos	Pos	1	2	2	2	Z

UA, unassigned. PCR amplification of Locus 19 was unsuccessful for FS3 and FS6. Locus 6 and Locus 19 were the main determinants for a genotype. Patient, FB2 was negative for MU. Pos, positive, Neg = negative, L6 = locus 6, L19 = locus 19.

doi:10.1371/journal.pntd.0003437.t001

compared to single bacilli in detritus (S1 Fig.). Twenty-five of the thirty-eight (66%) 16S positive samples were positive for IS2404. All four 16S positive soil samples were IS2404 positive and 64% of 16S positive biofilm samples tested positive for IS2404.

VNTR analysis of human samples reveals additional *M. ulcerans* ecovars

Fifteen suspected patients were included in this study following an active case surveillance. Fourteen were positive for 16S, IS2404 and ER (Table 1). ER sequence analysis showed >95% similarity to *M. ulcerans* except sample FY1 which had equal identities, 91%, to both *M. ulcerans* and *M. liflandii*. All 14 BU confirmed patients were recommended for treatment. VNTR-PCR was performed for IS2404 positive samples (14/15) and repeats confirmed with sequencing (Fig 2). Allelic profiles were written as (MIRU1, Locus 6, ST1, Locus 19). Four genotypes, designated, W (1, 1, 2, 1), X (1, 1, 2, 2), Y (1, 2, 2, 1) and Z (1, 2, 2, 2), were observed for human samples. Locus 6 and 19 were the main determinants of a particular genotype because each gave two repeats, 1 or 2. MIRU1 and ST1, invariably gave repeats of 1 and 2, respectively. Four samples showed genotype X, 4 showed genotype Y, 3 typed genotype Z and 2 as genotype W. However, one patient (FS5) had MU infection with two genotypes, X and W (Table 1) with band sizes at 280bp and 340bp at locus 19 (S2 Fig.), differentiating these genotypes. Genotypes for FS3 and FS6 were indeterminate because there was no amplification at locus 19. Interestingly, sample FY1 showed a partial repeat for locus 19 (Fig 2) leading to the profile Z.

Table 2. 16S and IS2404 positivity in sampled water bodies and matrices.

	N° 16S positive/total sampled (%)	N° IS2404 positive/total 16S positive (%)
Water bodies		
Wro-Offin	2/14 (14%)	2/2 (100%)
Wro-Bebonu	1/14 (7%)	1/1 (100%)
Mon-Offin	0/14 (0%)	0/0 (0%)
Mon-Nkotia	5/14 (36%)	4/5 (80%)
Mon-Ampoma	3/14 (21%)	2/3 (67%)
Bep-Oda	4/14 (29%)	4/4 (100%)
Suk-Offin	8/14 (57%)	5/8 (63%)
Suk-Twingun 1	3/14 (21%)	1/3 (34%)
Suk-Twingun 2	5/14 (36%)	4/5 (80%)
Suk-Nkotia	7/14 (50%)	2/7 (29%)
Total	38/140 (27%)	25/38 (66%)
Sample matrices		
Biofilm	22/50 (44%)	14/22 (64%)
Filter	10/30 (33%)	6/10 (60%)
Detritus	2/30 (7%)	1/2 (50%)
Soil	4/30 (13%)	4/4 (100%)
Total	38/140 (27%)	25/38 (66%)

Environmental samples were first screened for mycobacterial 16S rRNA positivity. Positive samples were then screened for IS2404. At each water body, biofilm were collected in quintuplicates. All other samples were collected in triplicates. Biofilm were the most positive, (22/38) for 16S and this difference in matrix positivity was statistically significant ($P = 0.0007$) using the Chi-square contingency table for independence.

doi:10.1371/journal.pntd.0003437.t002

Environmental samples showed similar *M. ulcerans* genotypes as those confirmed in patients

Six MU genotypes, W, X, Y, Z, A and B, were observed for environmental samples (Table 3), in IS2404 positive samples. *M. marinum* DL genotype E (1, 2, 1, 2) was observed in a biofilm sample from Twingun pond 2. A biofilm sample, BAB-4, collected from the Oda River, Bepotenten, showed a VNTR profile Y (1, 2, 2, 1) similar to a patient sample, FB1 (Table 1 and S2 Fig.), from the same community. Additional bands were observed, suggesting presence of other MPMS. A similar observation was made for BAF-3, which had ST1 repeat of 3 and was confirmed with sequencing as *M. marinum* M strain (Fig. 2). Also, we observed a unique genotype, OTS (1, 2, 7, ND) in soil and biofilm samples. Genotypes W, X, Y, A, B and E were observed in Sukuumu. Genotypes X and Y, OTS and Y, Z and Y, were observed in Wromanso, Monia-Gyaman and Bepotenten respectively. Twingun 2 pond had the most diverse genotypes ($n = 5$).

Increased discrimination of VNTR markers suggests heterogeneity of MU strains and corroborates previously reported genotypes in Ghana

Four MU genotypes, W (1, 1, 2, 1), X (1, 1, 2, 2), Y (1, 2, 2, 1) and Z (1, 2, 2, 2) were identified from both human and environmental samples. Comparing them to published MU genotypes, repeat variation (1 or 2), for Locus 6 and 19, were similar (S4 Table). MIRU1 and ST1 had conserved repeats of 1 and 2 respectively, for all human MU genotypes in this study. This again was consistent with the published MU genotypes, except for B^b, C, and the two Amansie MU strains 2 and 3. Amansie MU strains 1, 2 and 3, were profiles from Amansie West, Ghana [14].

Table 3. VNTR analysis of environmental samples.

Community	Water body	Type of matrix	VNTR allelic profiles				Genotypes
			MIRU1	Locus 6	ST1	Locus 19	
Wromanso							
	Bebonu pond	Biofilm					
		WBB-5	1	2	2	1	Y
		WBB-1	1	2	2	2	Z
Monia-Gyaman							
	Akotia stream	Biofilm					
		MNB	1	2	2	1	Y
		Detritus					
	Ampoma stream	MND	1	2	2	1	Y
		Soil					
		MNS	1	2	0	0	UA
		Biofilm					
		MPB	1	2	7	ND	OTS
		Detritus					
		MPD	1	2	2	1	Y
Bepotenten							
	Oda River	Biofilm					
		BAB-4	1	2	2	1	Y
		Filter					
		BAF-2	1	2	2	2	Z
		BAF-3	0	2	3	0	UA
Sukuumu							
	Offin River	Biofilm					
		SOB-5	1	2	2	0	Y-
		SOB-4	1	2	7	ND	OTS
		Filter					
		SOF-1	1	2	7	ND	OTS
		Soil					
		SOS-3	1	2	2	0	Y-
		SOS-3	1	2	7	ND	OTS
	Twingun 1 pond	Filter					
		STF	1	ND	1	ND	UA
	Twingun 2 pond	Biofilm					
		SKB-3	1	1	2	2	X
		SKB-4b	1	1	1	2	A
		SKB-5	1	2	2	1	Y
		SKB-2	1	2	1	2	E
		SKB-4a	3	1	1	2	B
	Akotia stream	Biofilm					
		SNB-5	1	1	2	1	W
		SNB-2	ND	1	4	1	UA

UA, unassigned, OTS, genotypic designation of unidentified MPM, NP, none positive. ND, not done, 0, no amplification. BAF-3 was confirmed as *M. marinum* from BLAST searches. Two water bodies (Wro-Offin and Mon-Offin) are not shown because no VNTR loci was amplified for any of the samples collected. MU presence was independent ($P = 0.8081$) of the type of water body (river, stream or pond).

doi:10.1371/journal.pntd.0003437.t003

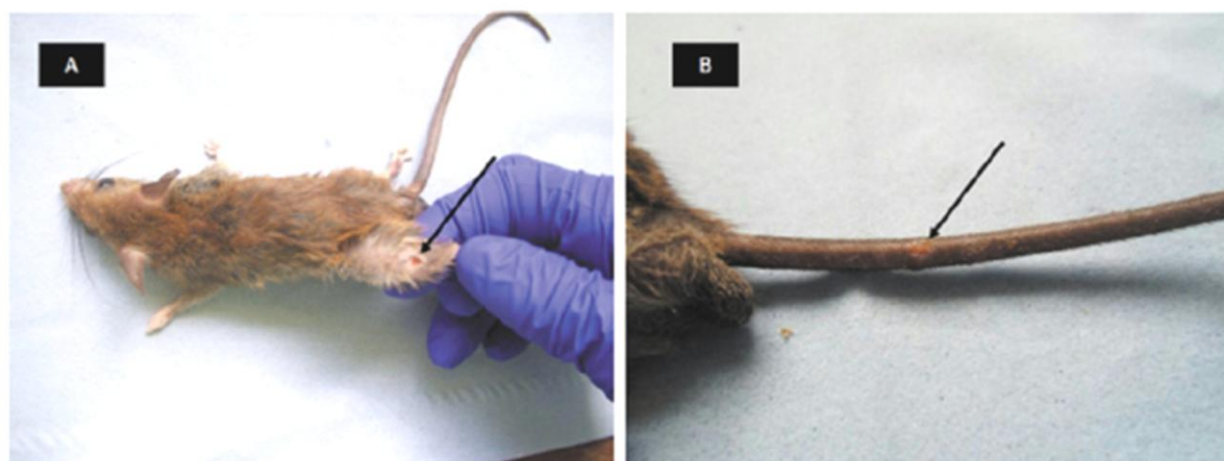


Figure 3. Two mice with lesions characteristic of BU. A) S6, had a lesion <1 cm on the left thigh. B) S11, with a lesion <1 cm on the tail. Lesion biopsy was positive for 16S rRNA, IS2404 and ER, which was confirmed as MU following sequencing.

doi:10.1371/journal.pntd.0003437.g003

and abdomen. Table 4 gives the PCR and sequence data analysis for the organs and lesions of the five small mammals. All five had at least one sample positive for 16S-PCR. However, sequences of the amplified 16S rRNA confirmed *Microthrix parvicella*, *Corynebacterium mastitidis* and *Corynebacterium macginleyi* in 3 animals (Table 4). 16S rRNA sequence of the lesion sample from a mouse, *Mastomys* spp, with Test ID S11, showed sequence similarity at 81% to the 16S rRNA of *M. ulcerans* Agy99 (accession N° NR 074861, GenBank). Additionally, sequencing of the IS2404 amplicon revealed 99% identity to *M. ulcerans* Agy99 partial, plasmid, pMUM001, GenBank accession N° CP000325.1 (S3 Fig.), and was also positive for ER. We have not been able to determine the VNTR profile of this sample yet.

Micro geo-distribution of genotypes suggests ponds harbour diverse *M. ulcerans* ecovars

We overlapped human and environmental VNTR profiles within our study communities to observe MU genotype distribution (Fig. 4). Genotype Y intersects both environment and human populations in all communities. Genotype Z was detected only in environmental

Table 4. Mycobacteria detection in organs of animals with lesions.

Mycobacteria detection in organs of animals with lesions							
Test ID	Genus	community	Trapping site	site of lesion	16S-positive organs	ER-positive organs	Isolate; sequence match
B8	<i>Rattus</i>	Bepoten	Oda River	Right ear	St, K	none	K; <i>M. parvicella</i>
W5	<i>Mastomys</i>	Wromanso	house	Tail	SI, K, SP, LS, AS	none	NA
W11	<i>Mastomys</i>	Wromanso	house	Abdomen	SI, St, CS	none	SI; <i>Corynebacterium mastitidis</i>
S6	<i>Mastomys</i>	Sukumu	house	left thigh	St	none	St; <i>Corynebacterium macginleyi</i> strain JCL-2
S11	<i>Mastomys</i>	Sukumu	house	Tail	Lu, CS, LB	LB*	LB; <i>M. ulcerans</i> strain Agy99

Stomach(St), Kidney(K), Small intestine(SI), Spleen(SP), Lesion biopsy(LB), Lesion swab(LS), caecum(CS), lungs(Lu), anal swab(AS). NA, not amplified.

* Also positive for IS2404 (99% sequence identity to MU Agy99). 16S positivity was used to infer presence of *Mycobacterium* spp in organs but IS2404 sequencing was used to confirm presence of MU.

doi:10.1371/journal.pntd.0003437.t004

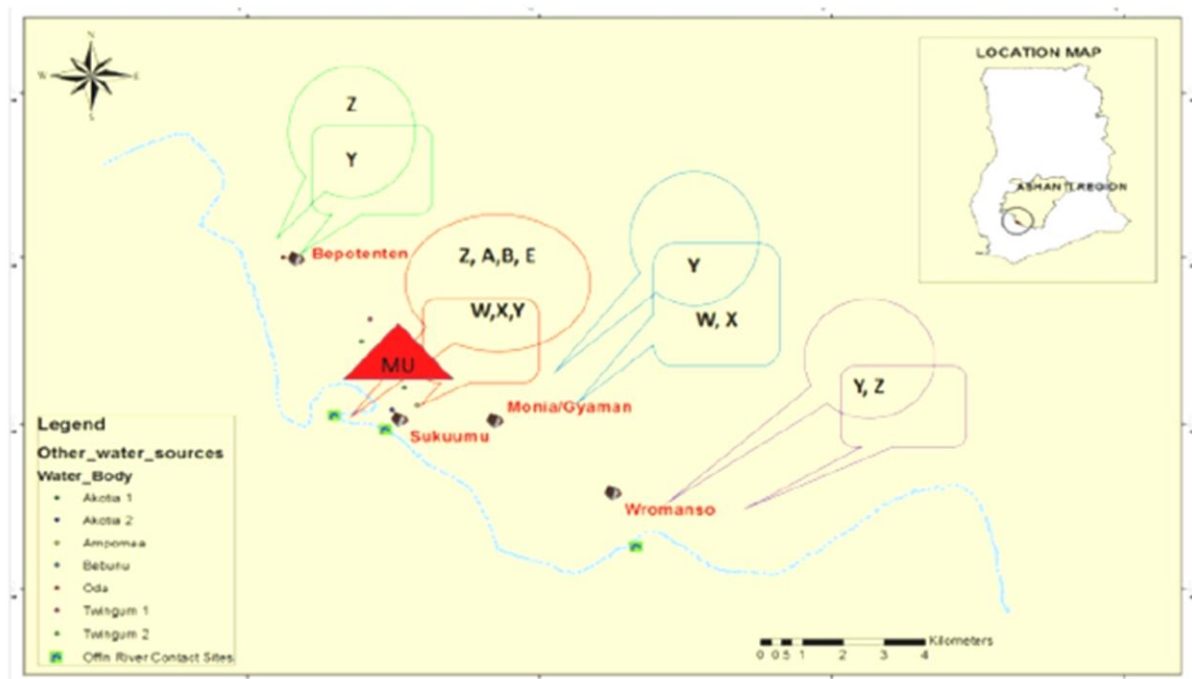


Figure 4. Community-based geographical distribution of MPM genotypes from humans and water bodies. The map of study communities was drawn using ArcMap 10. Rectangular and circular callouts contain genotypes of MU detected in humans and the environment respectively. Intersection of callouts contain genotypes common to both sources. Red triangle (in Sukuumu) represents MU-positive animal. Genotypes W, X, Y and Z were found both in the environment and human population. The Offin River is represented by blue dotted lines and contact sites on it are represented by green squares. Communities are represented by symbol for a house and other sampled water bodies are represented by colored dots as defined in the legend.

doi:10.1371/journal.pntd.0003437.g004

sources. A similar situation was observed in Monia where genotypes W and X were found in humans but not in environmental samples. Genotypes X and Y were detected in both the environment and in human infections in Wromanso. Sukuumu presented the most diverse genotypes, W, X and Y in both human and environmental samples and Z, A, B and E in the environment but not humans. The MU positive lesion sample, on the small mammal, was also detected in Sukuumu. In grouping genotypes from the three types of water bodies, we observed that ponds harboured 6/8 genotypes (X, Y, Z, A, B and E), rivers had 3/8 (Y, Z and OTS) and streams with 3/8 (W, Y and OTS). However, mycobacteria presence, particularly MU, was independent of the type of water body ($P = 0.8081$) when tested using the Chi-square contingency test for independence.

Discussion

Environmental MPMs are of enormous medical importance due to their ability to cause opportunistic infections in humans and other vertebrates [16]. A better understanding of their ecology is crucial to controlling the spread of diseases they cause. Although few studies have typed environmental and clinical isolates of MU, the broader geographical distribution of these environmental pathogens against observed focal infections in human populations [5, 13] still poses a challenge to transmission studies. This is the first study that attempted to focally type MU samples from populations, the environment and small mammals in four endemic communities with the aim of tracking infections to MU-contaminated environments.

Water contact by individuals in our study communities were high although the presence of bore wells minimized the use of surface water for drinking purposes. Community members however used surface waters for bathing and washing purposes. With nine of the ten (9/10) water bodies sampled being positive for MU, frequent usage and exposure could be source of MU infections to the communities. All MU genotypes detected in patient samples collected from a community were also found in at least one community associated water body.

Mycobacteria presence was higher in biofilm ($P = 0.0007$). Similarly, MU presence was higher in biofilm, consistent with other reports [5, 6]. These suggest biofilm as the preferred microhabitat for MU within aquatic environments. AFB microscopy revealed clumps of MU bacilli in biofilm samples as compared to single bacilli in detritus. Thus, future attempts to culture MU from the environment could focus on concentrating biofilm. Additionally, we noticed that at least one sample from any type of water body tested positive for IS2404. Although a preliminary confirmation of MPMs, it suggests that MU and other MPMs may be found in most fresh water bodies, in endemic communities.

Using four loci, we increased the discrimination power of VNTR typing to obtain four MU genotypes with similar allelic profiles consistent with previous data [6, 14] and showed that VNTR typing for environmental samples could give varying allelic combinations. Currently, MU is the only reported MPM causing BU in humans except a few reported cases in some small mammals [16]. In this study, we first genotyped MU samples from humans and then compared the profiles to samples obtained from water bodies frequently used by inhabitants, including patients. This helped to properly match genotypes from the two sources and establish a possible source of infection within each community. At least one genotype was common to both sources, in all four endemic communities, suggesting their water bodies as likely sources of infection. Furthermore, these water bodies, particularly, rivers, may serve as vehicles for the dissemination of MU strains [32] and could partly explain why genotype Y was found in all communities. The four MU genotypes; W, X, Y and Z, from humans were identical to those obtained in the environment. Phylogenetic analysis clustered some environmental samples with human samples, and showed significant sequence homology to reported MU orthologs [9, 23, 24]. Additionally, genotypes A, B and E (*M. marinum* DL), similar to those reported by Williamson *et al.* [6], were found only in the environment. Ponds harboured most of the genotypes including *M. marinum* DL, genotype E. This data is parallel with studies associating the disease with stagnant or slow moving water bodies [6–8]. Repeats of 1 and 2, for MIRU1 and ST1 respectively, were constant for all human samples but varied for environmental samples. This is consistent with that reported by Hilty and colleagues [14] for MU strains in the Amansie West District, which is adjacent to the area of this study. Loci 6 and 19, each with repeats of 1 and 2, were the determinants of these genotypes, corroborating findings by similar studies [6, 21, 22, 33]. These data suggest that while it may be sufficient to use loci 6 and 19 to discriminate between MU strains from humans, a combination of all four is necessary to match human isolates to environmental ecovars in transmission studies. There have been no reported cases of co-infection and this was shown in a recent study [33]. However, Our VNTR typing, confirmed with sequencing, showed that one patient had two strains of MU, genotypes W and X.

Interestingly, in the current study, genotype Y, with a VNTR profile of (1, 2, 2, 1) found in humans and water bodies, is identical to the purported *M. liflandii*, genotype, F (1, 2, 2, 1), reported by Williamson *et al.* [6]. *M. liflandii* has been reported as an environmental pathogen which causes infection in fishes and frogs and thus was considered a separate species [34]. However, recent sequencing and additional data on this pathogen suggest it is a *M. ulcerans* strain, *M. ulcerans* ecovar *liflandii* [35]. Thus, our data support this assertion and further suggest that genotype Y could be a pathogenic subtype of MU, which was previously considered

M. liflandii, a frog, *Xenopus laevis*, pathogen [6]. However, this needs to be confirmed using cultured isolates.

Furthermore, genotype Y, was ubiquitous in soil, biofilm and detritus, in most water bodies. It was the only genotype common to the two sources, within each community. Genotype Z, identified in filtrands and biofilm, appeared to share similar ecology and epidemiology as genotype Y. This observation may suggest that mycobacteria with this genotype are able to survive and proliferate in different parts of the water body. Hence, patients could frequently be exposed to them, in relation to other strains. This may explain why they were detected in 50% of human samples, across the four communities. However, our data does not imply high transmissibility of Y/Z-type strains to humans nor their relative virulence as suggested by a recent study [33].

MU presence was observed to be independent of the type of water body ($P = 0.8081$) but we observed that ponds harboured most of the genotypes in all the four communities. Thus, while MU may be widely distributed in the environment [6], strains of the bacteria may have microhabitat preferences and this could account for focal transmission of the pathogen in some endemic communities [6, 13]. Our data, although preliminary, provides a good basis for studies to investigate ecological preferences of MU strains. Although genotypes A and B were present in the environment, they were not typed in human samples. Arguably, our sample number was low, however, it could be that strains with these genotypes occupy microhabitats where human contact were infrequent. Samples with similar genotypes have been shown to cause infection in humans [33]. Efforts to culture these environmental samples were unsuccessful, consistent with similar observations by Williamson *et al* [33], suggesting that existing laboratory culture conditions may be unfavourable for certain mycobacteria. We uncovered MPMs with VNTR profile OTS (1, 2, 7, ND) and ST1 repeats of 3 (*M. marinum*), which have not been previously reported, consolidating earlier statements of presence of pathogenic strains with propensity to cause infection in aquatic vertebrates and other small mammals [6, 9, 16, 35]. However, isolation and culturing of these strains are needed to substantiate these assertions.

Small mammals including possums and grasscutters have been observed to have lesions characteristic of BU [16, 20]. Field studies conducted in Benin to identify mammalian reservoirs detected other mycobacteria but not MU [19]. We report on the first detection of MU DNA from a tail lesion of a mouse, *Mastomys spp*, trapped in Sukuuma, a BU endemic community in Ghana. We observed a lesion, <1cm on the tail. ER-PCR of the lesion biopsy specimen was positive. Interestingly, sequencing of the 16S rRNA and IS2404 amplicons showed greater than 81% and 98% identities respectively, to *M. ulcerans* strain Agy99. Our data, though preliminary, suggest that small mammals in BU endemic communities could be susceptible to MU infections. While these mammals may serve as reservoirs of MU, their definite role in transmission needs to be thoroughly investigated.

Several hypotheses for the transmission of MU bacilli from the environment to susceptible host have been put forth; bites from aquatic insects and mosquitoes, inoculation into open lesions and aerosolization of droplet nuclei [4, 36]. Activities including swimming, bathing and washing of clothes, irrigation, mining and certain agricultural activities may expose humans to MU. Individuals could be inoculated with MU, bacilli in biofilm, following a cut from a blade of grass. Within the aquatic system, there are complex interactions, where plants may provide substratum for MU to form biofilm [37], and aquatic vertebrates, e.g. fish may serve as reservoirs [38]. Additionally, a few aquatic insects have also been implicated in other proposed transmission routes [7]. Small mammals could infect humans with MU via bites, food and water contamination or handling during hunting. In turn, activities of these animals including drinking or searching for prey (fish, aquatic insects and food particles) around MU risk environments may expose them to infections [16]. Although the current study does not provide data on definite transmission route of MU or other MPMs, our results provide evidence to

show that BU patients or individuals living in BU endemic communities could be most likely infected from MU-contaminated water bodies. Measures to control MU infections, Buruli ulcer, should therefore consider adopting a "OneHealth" approach, where various interdisciplinary efforts linking human, environmental and animal health sciences, can be used to decipher definite transmission routes of the pathogen.

Conclusion

VNTR typing confirmed repeats previously reported by other studies and resolved the apparent homogeneity in MU isolates, in Ghana. In this study, we identified four *M. ulcerans* genotypes (W, X, Y, & Z) both in humans and sampled water bodies in the Amansie Central District of the Ashanti region, Ghana. Other previously reported *M. ulcerans* genotypes (A & B) and *M. marinum* DL, genotype E, were detected only in water bodies. Confirmation of repeat numbers by sequencing showed that certain MU strains harboured partial repeats and other MPMs had repeats not previously reported. Genetic comparisons and geo-distribution of genotypes were used to source track MU infections to specific water bodies. Our findings suggest that patients may have been infected from local water body sources, which also serve as reservoirs and vehicles for the dissemination of MU strains and other MPMs in endemic communities. Transmission of MU could involve several routes where humans have contact with risk environments. Further, we present evidence that small mammals within endemic communities could be susceptible to MU infections and may be acting as reservoirs. Thus, we support the hypothesis that transmission of MPMs, particularly, *M. ulcerans*, is dependent on the overlapping habitats of the pathogen and humans.

Supporting Information

S1 Fig. Comparison of AFB in two environmental samples. A) Shows a cord (clump of bacilli) of acid fast bacilli in a biofilm sample and B) shows individual bacilli (detritus sample) as shown by the arrow. (X1000 magnification)
(TIF)

S2 Fig. Gel picture showing VNTR profiles of environmental and human *M. ulcerans* ecovars. FB1 is a human sample from Bepotenten and BAB-4 is a biofilm sample from Oda River, Bepotenten. Both typed genotype Y (1, 2, 2, 1). Additional band higher up in lane 4 of BAB-4 may suggest presence of other MPMs with more than 3 repeats for Locus 19. FS5 is a human sample taken from Sukuumu, which had two genotypes X (1, 1, 2, 2) and W (1, 1, 2, 1). Band sizes at lane, 340bp and 280bp, separated X and W respectively. Lanes 1, 2, 3 and 4 represent MIRU1, Locus 6, ST1 and Locus 19 respectively, for both upper and lower gels. Both gels were run with negative controls (Neg Ctrl).
(TIF)

S3 Fig. Genetic relatedness of environmental samples using IS2404 phylogeny. All environmental samples, together with the animal and human samples, formed a single cluster with reported *M. ulcerans* orthologs. The evolutionary history was inferred using the UPGMA method [39]. The optimal tree with the sum of branch length = 1.31639434. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches [40]. The reference sequences of the insertion sequence (IS2404) are represented with squares. Sequences of human and environmental samples are represented with triangles and circles respectively. The MU-positive animal sample (S11LB) is represented by the black dot.
(TIF)

S1 Table. Activities around water bodies.

(DOCX)

S2 Table. List of primers used for PCR amplifications.

(DOCX)

S3 Table. Livelihood strategies.

(DOCX)

S4 Table. VNTR profiles and MPM strain designated genotypes of current study and from published data. W, X, Y and X are *M. ulcerans* designated genotypes from current study. A, B, C, and D are *M. ulcerans* designated genotypes from literature. Other published MPM genotypes; E is *M. marinum* DL, MPS is *M. pseudoshottsii*, MM is *M. marinum* and F is *M. liflandii*. ^a & ^c means identical, ^b means same genotype as in current study. ND, not done. Gh seq, Ghana sequence.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Samuel Abbey, Elizabeth Gyamfi, Akwasi Dwomoh and Phyllis Antwi for their assistance with the field work. We also thank Timothy Mensah (Amansie District Health Directorate) for helping to recruit patients into the study. Nana Bofoa Williams assisted with molecular work on the animal samples.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CAN LM CQ BB DAB. Performed the experiments: CAN LM CQ. Analyzed the data: CAN LM CQ DKdS CD. Contributed reagents/materials/analysis tools: LM BB DAB DKdS. Wrote the paper: CAN LM CQ CD DOK SCKT DKdS DAB BB.

References

1. WHO, Number of new cases of Buruli ulcer reported, 2010. 2010. WHO: apps.who.int.
2. Johnson P.D., et al., Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. PLoS Med, 2005. 2(4): p. e108. doi: [10.1371/journal.pmed.0020108](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020108) PMID: [15839744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15839744/)
3. Ross B.C., et al., Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. Appl Environ Microbiol, 1997. 63(10): p. 4135–8. PMID: [9327583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9327583/)
4. Portaels F., et al., Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. Lancet, 1999. 353(9157): p. 986. doi: [10.1016/S0140-6736\(98\)05177-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)05177-0) PMID: [10459918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10459918/)
5. Williamson H.R., et al., Detection of *Mycobacterium ulcerans* in the Environment Predicts Prevalence of Buruli Ulcer in Benin. PLoS Negl Trop Dis, 2012. 6(1): p. e1506. doi: [10.1371/journal.pntd.0001506](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001506) PMID: [22303498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22303498/)
6. Williamson H.R., et al., Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. PLoS Negl Trop Dis, 2008. 2(3): p. e205. doi: [10.1371/journal.pntd.0000205](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000205) PMID: [18365034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18365034/)
7. Merritt R.W., et al., Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. PLoS Negl Trop Dis, 2010. 4(12): p. e911. doi: [10.1371/journal.pntd.0000911](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000911) PMID: [21179505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21179505/)
8. Raghunathan P.L., et al., Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* infection): results from a case-control study in Ghana. Clin Infect Dis, 2005. 40(10): p. 1445–53. doi: [10.1086/429623](https://doi.org/10.1086/429623) PMID: [15844067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15844067/)
9. Stinear T. and Johnson P.D.R., From *M. marinum* to *ulcerans*: a *Mycobacterium* Human Pathogen Emerges. Microbe, 2007. 2.
10. Bist F., et al., Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). Vet Res, 2005. 36(3): p. 411–36. doi: [10.1051/vetres:2005001](https://doi.org/10.1051/vetres:2005001) PMID: [15845232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845232/)

11. Portaels F., et al., First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the environment. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008. 2(3): p. e178. doi: [10.1371/journal.pntd.0000178](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000178) PMID: [18365032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18365032/)
12. Kaser M., et al., Large sequence polymorphisms unveil the phylogenetic relationship of environmental and pathogenic mycobacteria related to *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(17): p. 5667–75. doi: [10.1128/AEM.00446-09](https://doi.org/10.1128/AEM.00446-09) PMID: [19592526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19592526/)
13. Rottgen K., et al., Single nucleotide polymorphism typing of *Mycobacterium ulcerans* reveals focal transmission of buruli ulcer in a highly endemic region of Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. 4(7): p. e751. doi: [10.1371/journal.pntd.0000751](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000751) PMID: [20652033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20652033/)
14. Hilty M., et al., Genetic diversity in *Mycobacterium ulcerans* isolates from Ghana revealed by a newly identified locus containing a variable number of tandem repeats. *J Bacteriol*, 2006. 188(4): p. 1462–5. doi: [10.1128/JB.188.4.1462-1465.2006](https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1462-1465.2006) PMID: [16452429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16452429/)
15. Mitchell P.J., Jerrett I.V., and Slee K.J., Skin ulcers caused by *Mycobacterium ulcerans* in koalas near Bairnsdale, Australia. *Pathology*, 1984. 16(3): p. 256–60. doi: [10.3109/00313028409068533](https://doi.org/10.3109/00313028409068533) PMID: [6514393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6514393/)
16. Fyfe J.A., et al., A major role for mammals in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. 4(8): p. e791. doi: [10.1371/journal.pntd.0000791](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000791) PMID: [20706592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20706592/)
17. O'Brien C.R., et al., Clinical, Microbiological and Pathological Findings of *Mycobacterium ulcerans* Infection in Three Australian Possum Species. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014. 8(1): p. e2686. doi: [10.1371/journal.pntd.0002686](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002686) PMID: [24498451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24498451/)
18. Walsh D.S., et al., Transmission of *Mycobacterium ulcerans* to the nine-banded armadillo. *Am J Trop Med Hyg*, 1999. 61(5): p. 694–7. PMID: [10586896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10586896/)
19. Dumez L., et al., First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Appl Environ Microbiol*, 2008. 74(3): p. 768–73. doi: [10.1128/AEM.01193-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01193-07) PMID: [18065608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18065608/)
20. Addo P., et al., Clinical and histopathological presentation of Buruli ulcer in experimentally infected grasscutters (*Thryonomys swinderianus*). *Internet J. Trop. Med.*, 2007. 3:e2.
21. Abiordey A., et al., Comparative nucleotide sequence analysis of polymorphic variable-number tandem-repeat loci in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(10): p. 5281–4. doi: [10.1128/JCM.43.10.5281-5284.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5281-5284.2005) PMID: [16207997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16207997/)
22. Abiordey A., et al., Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(4): p. 1546–51. doi: [10.1128/JCM.43.4.1546-1551.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1546-1551.2005) PMID: [15814964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15814964/)
23. Hilty M., et al., Analysis of the *Mycobacterium ulcerans* genome sequence reveals new loci for variable number tandem repeats (VNTR) typing. *Microbiology*, 2007. 153(Pt 5): p. 1483–7. doi: [10.1099/mic.0.2006/004564-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004564-0) PMID: [17464062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17464062/)
24. Lavender C.J., et al., Evaluation of VNTR typing for the identification of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples from Victoria, Australia. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. 287(2): p. 250–5. doi: [10.1111/j.1574-6968.2008.01328.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01328.x) PMID: [18754785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18754785/)
25. Stragier P., et al., Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Bacteriol*, 2005. 187(5): p. 1639–47. doi: [10.1128/JB.187.5.1639-1647.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1639-1647.2005) PMID: [15716434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15716434/)
26. Primm T.P., Lucero C.A., and Falkinham J.O. 3rd, Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 2004. 17(1): p. 98–106. doi: [10.1128/CMR.17.1.98-106.2004](https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.98-106.2004) PMID: [14726457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14726457/)
27. Addo P., et al., Findings from a buruli ulcer mouse model study. *Ghana Med J*, 2005. 39(3): p. 88–93. PMID: [17299550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17299550/)
28. Yeboah-Manu D., et al., Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from swab and fine-needle-aspiration specimens. *J Clin Microbiol*, 2011. 49(5): p. 1997–9. doi: [10.1128/JCM.02279-10](https://doi.org/10.1128/JCM.02279-10) PMID: [21411582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21411582/)
29. Hughes M.S., et al., Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol*, 1993. 31(12): p. 3216–22. PMID: [7508456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7508456/)
30. Abiordey A., et al., Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. 6(4): p. e1590. doi: [10.1371/journal.pntd.0001590](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001590) PMID: [22509415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22509415/)
31. Tamura K., et al., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011. 28: p. 2731–2739. doi: [10.1093/molbev/msr121](https://doi.org/10.1093/molbev/msr121) PMID: [21546353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21546353/)
32. Tortoli E., The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006. 48(2): p. 159–78. doi: [10.1111/j.1574-695X.2006.00123.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00123.x) PMID: [17064273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17064273/)

33. Williamson H., et al., Genetic Diversity of PCR-Positive, Culture-Negative and Culture-Positive *Mycobacterium ulcerans* Isolated from Buruli Ulcer Patients in Ghana. PLoS ONE, 2014. 9(2): p. e88007. doi: [10.1371/journal.pone.0088007](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088007) PMID: [24520343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24520343/)
34. Mve-Oblang A., et al., A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of *Xenopus* species with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the *Mycobacterium ulcerans* macrolide toxin. Infect Immun, 2005. 73(6): p. 3307–12. doi: [10.1128/IAI.73.6.3307-3312.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3307-3312.2005) PMID: [15908356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15908356/)
35. Tobias N.J., et al., Complete genome sequence of the frog pathogen *Mycobacterium ulcerans* ecovar Uflandii. J Bacteriol, 2013. 195(3): p. 556–64. doi: [10.1128/JB.02132-12](https://doi.org/10.1128/JB.02132-12) PMID: [23204453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23204453/)
36. Johnson P.D. and Lavender C.J., Correlation between Buruli ulcer and vector-borne notifiable diseases, Victoria, Australia. Emerg Infect Dis, 2009. 15(4): p. 614–5. doi: [10.3201/eid1504.081162](https://doi.org/10.3201/eid1504.081162) PMID: [19331750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19331750/)
37. Marsollier L., et al., Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol, 2004. 70(10): p. 6296–8. doi: [10.1128/AEM.70.10.6296-6298.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6296-6298.2004) PMID: [15466578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15466578/)
38. Eddyani M., et al., Potential role for fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): an environmental study. Appl Environ Microbiol, 2004. 70(9): p. 5679–81. doi: [10.1128/AEM.70.9.5679-5681.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5679-5681.2004) PMID: [15345458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15345458/)
39. Sneath P.H.A. and Sokal R.R., Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, 1973.
40. Felsenstein J., Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 1985. 39: p. 783–791. doi: [10.2307/2406678](https://doi.org/10.2307/2406678)
41. Benson G., "Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences". Nucleic Acids Research, 1999. 27(2): p. 573–580. doi: [10.1093/nar/27.2.573](https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573) PMID: [9862962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9862962/)

Résumé

L'endémicité de l'ulcère de Buruli (UB), infection à mycobactérie non tuberculeuse (MNT), est la plus élevée en Côte d'Ivoire (39,6 % des nouveaux cas dans le monde en 2013). Des études épidémiologiques ont identifié la mycobactérie productrice de mycolactone (MPM), *Mycobacterium ulcerans*, comme agent pathogène et ont montré que les milieux aquatiques constituent la principale source de l'infection. Plusieurs réservoirs environnementaux sont suspectés dans la transmission à l'homme mais, le mode de transmission reste inconnu. Ainsi, en supposant que leur transmission dépendrait du chevauchement de leur habitat écologique et ceux de l'homme et des animaux, cette étude a eu pour but de caractériser les MNT, en particulier *M. ulcerans* et les autres MPM à l'interface homme-animal-environnement, afin d'élucider les possibles modes de transmission.

Cette caractérisation a été réalisée aussi bien pour des environnements à risque incluant de potentiels réservoirs mais également des isolats de cas d'infection cliniques, au sein de cinq localités endémiques de l'UB. Il s'est agi de deux localités du Centre-ouest (Zaïbo, Gorodi) et de trois localités du Sud-est (Léléblé, Sokrogbo, Ahondo) de la Côte d'Ivoire. La collecte des échantillons a abouti à 195 matrices environnementales (biofilms, sols, détritiques de plantes et filtrats d'eau) issues de 15 points d'eau couramment utilisés par les communautés ; 35 aspirations à l'aiguille fine et écouvillons de lésions chez 30 cas cliniques ; des échantillons d'organes et lésions provenant de 111 rongeurs piégés dont 8 présentant des lésions suspectes.

Après extraction de l'ADN, un criblage utilisant le gène mycobactérien 16S rRNA et IS2404 est effectué pour la détection de *Mycobacterium spp* et des MPM, suivie par un typage VNTR (MIRU1, locus 6, ST1, locus 19) des isolats de MPM. La majorité des matrices environnementales (52,8 % pour 16S rRNA, 8,7 % pour IS2404) sont contaminées par les MPM avec pour la plupart les filtrats d'eau. Tous les loci VNTR n'ont pu être amplifiés avec ces échantillons mais, leur séquençage a identifié des isolats de *M. ulcerans* Agy99 et *M. liflandii*, au niveau des environnements contaminés. De potentiels réservoirs animaux sont également identifiés par la confirmation de lésions suspectes observées chez deux rongeurs (GP3a et ST1), appartenant à l'espèce *Mastomys natalensis*, avec 94 % et 98 % de similarité de séquences respectivement, pour la souche *M. ulcerans* Agy99. Par ailleurs, 94,3 % des 35 lésions des cas d'infection chez l'homme sont confirmées. Le typage VNTR de ces échantillons a identifié cinq génotypes de *M. ulcerans* notamment Q, R, S, T, U ; le profil Q correspondant au profil VNTR C de *M. ulcerans* précédemment décrit en Côte d'Ivoire et au Ghana.

Ces résultats mettent en évidence la présence des MNT au sein des localités étudiées et suggère le rôle de l'environnement dans leur diffusion incluant les petits mammifères comme sources d'infection. Un nouveau typage VNTR des isolats issus de l'environnement, des cas d'infection chez l'homme et les animaux, permettrait donc de retracer précisément la source de l'infection aux MNT chez l'homme. Sur cette base, les modes possibles de transmission pourraient alors être élucidés afin de promouvoir des politiques de contrôle plus adaptées au sein des communautés affectées par la maladie.

Mots clés: environnement, homme, mycobactéries non tuberculeuses, transmission, ulcère de Buruli

Abstract

The endemicity of Buruli ulcer (BU), a non-tuberculous mycobacteria (NTMs) infection, is the highest in Côte d'Ivoire (39.6 % of worldwide new cases in 2013). Epidemiological studies identified the mycobacteria producing mycolactone (MPMs), *Mycobacterium ulcerans*, as the causative agent and showed that aquatic environments represent the main source of infection. Many environmental reservoirs are suspected in transmission to humans; however, the exact transmission mode remains unknown. Thus, assuming that their transmission depends on the overlapping ecology of human and animal habitats, this study aimed to characterize NTMs, particularly *M. ulcerans* and other MPMs, within human-environment-animal interface, in order to elucidate possible transmission routes.

The characterization was performed for suspected environments including potential reservoirs as well as for human isolates of infection cases, within five BU endemic localities. There were two in Western Centre (Zaïbo, Gorodi) and three in Eastern South (Léléblé, Sokrogbo, Ahondo) areas in Côte d'Ivoire. The biological material collected included 195 environmental matrices (biofilms, soils, plant detritus and water filtrates) from 15 water bodies usually used by communities; 35 fine needle aspirations and swabs from lesions of 30 human cases of infection; organs and lesions samples from 111 trapped rodents from which 8 were observed with BU-like lesions.

After DNA extraction, a screening for *Mycobacterium spp* and MPM using the mycobacterial 16S rRNA and IS2404 genes was performed. Then, VNTR loci (MIRU1, locus 6, ST1 and locus 19) were used to genotype isolates of MPMs. The majority of environmental matrices (52.8 % for 16S rRNA, 8.7 % for IS2404) were contaminated by MPM with mostly water filtrates. All the VNTR loci were not amplified with these samples but sequencing of positive ones identified *M. ulcerans* Agy99 and *M. liflandii*, among contaminated environments. Potential reservoirs were also identified regarding BU-like lesions, from two rodents (GP3a and ST1) belonging to *Mastomys natalensis* species, which showed 94 % and 98 % similarity with *M. ulcerans* Agy99 strain respectively. Besides that, 94.3 % of the 35 lesions of human infection were confirmed. VNTR typing of positive human samples identified five *M. ulcerans* genotypes, designated Q, R, S, T, and U; profile Q matching with the previously reported genotype C of *M. ulcerans*, common in Côte d'Ivoire and Ghana.

These results highlight the presence of NTMs within investigated localities and suggest the role of environment in their dissemination including small mammal as infection sources. A new VNTR typing of isolates from contaminated environments, human and animal infection cases would allow precise source tracking of NTMs involved in human infection. Based on that, possible transmission pathways could be elucidated to ultimately promote adapted control policies in affected communities.

Key words: environment, human, non-tuberculous mycobacteria, transmission, Buruli ulcer