



**HAL**  
open science

# Facteurs associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dans les départements de l'Ouémé et du Plateau au Sud Bénin

Mahougnon Degnonvi

► **To cite this version:**

Mahougnon Degnonvi. Facteurs associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dans les départements de l'Ouémé et du Plateau au Sud Bénin. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2021. Français. NNT: 2021ANGE0057. tel-03641385

**HAL Id: tel-03641385**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03641385>**

Submitted on 14 Apr 2022

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

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

# THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS ET DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

ECOLE DOCTORALE N° 605

ECOLE DOCTORALE

*Biologie Santé (Université d'Angers)*

*Sciences de la Santé (Université d'Abomey-Calavi)*

Discipline / Spécialité : Médecine, Biologie et Santé Publique / Epidémiologie et Interventions en Santé Publique

Par

**Mahougnon Horace Renaud Fabrice DEGNONVI**

**Facteurs associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli  
dans les départements de l'Ouémé et du Plateau au Sud du Bénin**

Année universitaire 2020/2021

Thèse présentée et soutenue publiquement le 03 Décembre 2021

Unités de recherche : CRCINA INSERM U1232, équipe ATOMyCA et Laboratoire HECOTES, CIFRED, UAC

Thèse N° :

## Composition du jury

**Président du Jury : Dr Dismand HOUINATO**, HDR, Professeur Titulaire des Universités (CAMES), Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**Rapporteurs :**

**Dr Sara EYANGO**, HDR, Directeur de Recherche, Centre Pasteur du Cameroun

**Dr Mathieu EVEILLARD**, HDR, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Angers, Université d'Angers, France

**Dr Dismand HOUINATO**, HDR, Professeur Titulaire des Universités (CAMES), Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**Examineurs :**

**Dr Ghislain E. SOPOH**, Maître de Conférences Agrégé des Universités (CAMES), Institut Régional de Santé Publique CAQ, Ouidah, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**Directeurs de thèse :**

**Dr Estelle MARION**, Chargée de Recherche, INSERM U1232, CRCINA, équipe ATOMyCA, HDR Sciences de la vie, Université d'Angers, France

**Dr Roch C. JOHNSON**, Professeur Titulaire des Universités (CAMES), CIFRED, HECOTES, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, HDR Sciences de la vie, Université d'Angers, France

**Mention : Très Honorable avec les félicitations du Jury**

## **Sommaire**

Résumé.....	iii
Abstract .....	iv
Remerciements.....	v
Sigles et abréviations.....	viii
Introduction.....	1
Chapitre 1. Synthèse bibliographique et fondements théoriques.....	3
Chapitre 2. Buruli ulcer in Africa : Benin and Cameroon cases .....	45
Chapitre 3. Cadre et méthodes .....	65
Chapitre 4. Effect of well drilling on Buruli ulcer incidence in Benin : a case – control quantitative survey .....	78
Chapitre 5. A combined field study of Buruli ulcer disease in southeast Benin using epidemiological, geographical, behavioral and environmental analysis to propose preventative strategies .....	89
Chapitre 6. Discussion générale.....	130
Conclusion .....	144
Bibliographie .....	146

## Remerciements

Nous remercions le Professeur Roch Christian Johnson (RCJ), non seulement pour l'encadrement scientifique mais aussi pour son soutien permanent à travers ses encouragements et les différents fonds et bourses d'études qu'il nous a aidé à obtenir pour mener à bien notre formation. Nous étions presque en détresse lorsque nous vous avons envoyé le premier mail pour vous exprimer notre désir de travailler avec vous. Nous avouons que cela n'a pas du tout été facile d'avoir votre feedback après plusieurs mails, messages et appels téléphoniques. Mais un après midi, n'ayant plus trop d'espoir pour continuer dans la recherche médicale après une expérience sordide, nous recevions un appel surprise qui relança non seulement notre carrière mais toute une vie. Quelques secondes « Salut Horace, C'est Dr Johnson... Je serai en mission au Burkina à partir de demain. Passe me voir le vendredi au Bureau » ont suffi au Professeur RCJ pour nous redonner envie et espoir de continuer. Nous le remercions particulièrement pour la confiance qu'il a toujours placée en nous. Il nous a laissé l'entière responsabilité au niveau de toutes les activités de recherche sur le terrain. Nous lui témoignons toute notre gratitude car ceci nous procura une opportunité unique d'échanges entre nos connaissances théoriques et pratiques.

Chers Professeurs Ghislain Sopoh et Sossa Jérôme, lorsque nous étions à l'Institut Régional de Santé Publique (IRSP), vous étiez nos premiers secours et soutiens sur tous les plans. Recevez ici nos sincères et profondes gratitudes.

Nos remerciements vont à tout le personnel enseignant, administratif et les chercheurs de la Faculté de Santé, du Service Universitaire de Médecine Préventive et de Promotion de la Santé de l'université d'Angers, de l'Institut de Biologie en Santé du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers. Nous remercions tout particulièrement le Pr Alexandre de la faculté de médecine de Nantes qui en quelques heures d'échanges nous a permis d'avoir une connaissance très approfondie des méthodes et concepts d'études en épidémiologie. Nous remercions également tous les enseignants, chercheurs juniors et seniors de l'IRSP et du Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (CIFRED).

A Estelle Marion, notre co-directrice de thèse, mille merci pour tout ce que tu as fait pour nous tout au long de ces cinq belles années. Nous avons appris beaucoup de toi et Laurent Marsollier. Lorsque tu nous fais appel dans ton bureau au CHU d'Angers et que tu ajoutes « Horace, peux-tu fermer la porte derrière toi s'il te plaît », je me dis au fond de moi, « Horace, tu as encore fait quoi, ça va chauffer dans un instant avec la patronne ». Que cela soit autour d'une bière à

pression bien fraîche à Genève, Paris, Angers, Cotonou où autour d'un plat de poulet bicyclette sur le parc à l'air libre à Pobè, nous étions contents mais toujours sur nos gardes car des remarques, observations, remontrances surgiraient à n'importe quel moment des soirées... Cela nous a beaucoup aidé et nous avons beaucoup appris de toutes ces occasions. Même si sur le coup, nous ne partageâmes pas toujours ton avis, avec un peu de recul et d'analyse introspective, nous nous rendons compte que tu faisais tout cela de façon objective et sans arrière-pensée. Si nous devrions retenir une seule chose de toi et Laurent Marsollier, nous dirons « Nous devons toujours être « orienté-résultat » et viser la perfection en tout et ne donner aucune excuse ou explication à un objectif non atteint ».

A Laurent Marsollier, Sébastien Fleuret, merci à tous d'avoir contribué à mon perfectionnement tant sur le plan professionnel que personnel. Nous avons appris de vous que l'humilité et la remise en question personnelle sont des clés de voûtes pour un chercheur quel que soit ses compétences techniques et professionnelles.

Nous adressons une mention spéciale à Saturnin Hounsou, plus qu'un collaborateur, tu as été un très bon compagnon de fortune pendant ces trois années. Nous avons bravé la pluie, la poussière nébuleuse à moto et à véhicule, parfois au-delà de minuit car nous tenions à aller conditionner tous les échantillons à temps au laboratoire. Que le Dieu tout puissant te le rende au centuple. Tu nous as été très utile lors de la collecte des données épidémiologiques et surtout environnementales. A toi, Alexandra Boccarossa, brave femme de terrain, pour ta contribution à la réalisation de l'étude en Sciences Humaines et Sociales (SHS), reçois nos chaleureux remerciements. Nous devrions normalement fêter ces moments ensemble à Angers autour d'une bouteille de vin et de la viande grillée par Estelle et Laurent Marsollier comme d'habitude mais à cause de coronavirus, nous le feront certainement à distance.

Anita Wadagni, nous te disons merci pour tout. Tu as été plus qu'une grande sœur pour nous. Reçois les bénédictions divines infinies. Longue vie et une carrière prospère à toute la deuxième promotion de thèse de doctorat de l'IRSP.

Nous remercions les organismes qui nous ont soutenu financièrement pour cette formation, en particulier la Fondation Raoul Follereau (FRF) de France, la région pays de la Loire, le Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA), l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) et le Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (CIFRED) pour nous avoir offert le cadre et l'environnement adéquats pour la réalisation de ces travaux.

Nous remercions toute notre famille et nos bien-aimés Rafatou Abiodou, Monique Wanmasse,

Patricia Hekpazo, Diane Fayomi, Victoire Codjia, Basile Degnonvi, Hénoek Degnonvi, Naomie Degnonvi, Esther Degnonvi pour leurs affections, encouragements, et surtout leur patience pour supporter tout ce moment où nous avons été physiquement absents. Qu'ils voient à travers cette thèse le fruit de nos souffrances communes.

A nos amis et compagnons Zoukifl Salou-Bachirou, Hermione Amoukpo, Feu Macaire Fadodougbo, Iris Fandohan, Wari Moussa, nous vous remercions pour votre amitié et soutien qui ne nous ont jamais fait défaut.

A tout le personnel médical et administratif du Centre de Dépistage et de Traitement de Lèpre et de l'Ulcère de Buruli (CDTLUB) de Pobè, qui était toujours disponible pour nous accompagner quel que soit le besoin exprimé. Merci à Bello, Pierre, Oswald pour tout ce que vous aviez fait pour nous pendant ces belles années. Ce travail est le résultat de l'effort de nous tous.

Nous ne saurions oublier tous les amis et collègues avec qui nous avons collaboré au Bénin, en France, en Suisse, au Canada, aux USA et en Angleterre dans le cadre de cette thèse.

Merci à tous les patients qui ont accepté de participer à cette étude.

Nous rendons grâce enfin, à notre Seigneur qui nous a toujours assisté à travers son Esprit-Saint.

## Sigles et abréviations

<b>ADN</b>	:	Acide Désoxyribo Nucléique
<b>ARV</b>	:	AntiRétro Viral
<b>BAAR</b>	:	Bacille Acido-Alcool-Résistant
<b>BCG</b>	:	Bacille Calmette-Guérin
<b>BPC</b>	:	Bonnes Pratiques Cliniques
<b>CDTLUB</b>	:	Centre de Dépistage et de Traitement de la Lèpre et de l'Ulcère de Buruli
<b>CHU</b>	:	Centre Hospitalier Universitaire
<b>CIFRED</b>	:	Centre Inter Facultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable
<b>CNERS</b>	:	Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé
<b>COVID 19</b>	:	Coronavirus 2019
<b>CRCINA</b>	:	Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers
<b>FRF</b>	:	Fondation Raoul Follereau
<b>IMUB</b>	:	Initiative Mondiale de lutte contre l'Ulcère de Buruli
<b>INSERM</b>	:	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
<b>IRSP</b>	:	Institut Régional de Santé Publique
<b>MEM</b>	:	Ministère de l'Eau et des Mines
<b><i>Mu</i></b>	:	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<b>MSF</b>	:	Médecins Sans Frontière
<b>MTN</b>	:	Maladies Tropicales Négligées
<b>OMS</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONG</b>	:	Organisation Non Gouvernementale
<b>PCR</b>	:	Polymerase Chain Reaction
<b>PCT</b>	:	PolyChimioThérapie
<b>PKS</b>	:	Polyketide Synthases
<b>PNG</b>	:	Papouasie-Nouvelle-Guinée
<b>RCA</b>	:	République Centre Africaine
<b>RDC</b>	:	République Démocratique du Congo
<b>SUMPPS</b>	:	Service Universitaire de Médecine Préventive et de Promotion de la Santé
<b>UB</b>	:	Ulcère de Buruli
<b>UEMOA</b>	:	Union Economique Monétaire Ouest Africaine
<b>VIH</b>	:	Virus de l'Immuno déficience Humaine

## Liste des photos

Photo 1: Zone d'endémicité et vecteurs possibles de transmission de <i>Mu</i> .....	14
Photo 2: Prélèvements pour le diagnostic de l'infection à <i>Mu</i> .....	26
Photo 3 : Aspects anatomopathologiques de l'infection à <i>Mu</i> .....	27
Photo 4: Formes pré-ulcératives de l'ulcère de Buruli.....	30
Photo 5 : Formes ulcératives et disséminées de l'ulcère de Buruli, séquelles et cicatrisation spontanée.....	31
Photo 6 : Centre de Dépistage et de Traitement de la Lèpre et de l'Ulcère de Buruli de Pobè	68

## **Liste des tableaux**

Tableau I : Pays ayant déjà déclaré un cas d'UB .....	6
Tableau II : Classification selon Runyon des mycobactéries en fonction de leur groupe.....	9

## Liste des figures

Figure 1: Répartition des cas d'ulcère de Buruli rapportés en 2018 dans le monde .....	7
Figure 2: Structure de la mycolactone A/B .....	10
Figure 3 : Modèle de l'écologie et de la transmission de <i>Mu</i> .....	15
Figure 4 : Modèle de transmission de <i>Mu</i> entre l'environnement, les moustiques, les opossums et les humains en Australie. ....	16
Figure 5 : Proposition de modèle de mécanisme de la transmission de <i>Mu</i> .....	17
Figure 6 : Schéma de l'approche conceptuelle des facteurs environnementaux et anthropiques associés à la variation de l'ulcère de Buruli dans les départements de l'Ouémé - Plateau au Sud du Bénin.....	41
Figure 7 : Schéma de recherche représentant l'interaction de l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de <i>Mu</i> .....	43
Figure 8 : Carte administrative du Bénin représentant les douze départements.....	67
Figure 9 : Carte du Bénin représentant les départements et les communes les plus endémiques de l'UB de 2006 à 2021 .....	69
Figure 10 : Modèle de prévention primaire de l'ulcère de Buruli .....	143

## Introduction

L'infection à *Mycobacterium ulcerans* (*Mu*) communément appelée ulcère de Buruli (UB), « Tèfoun Tèfoun » en langue Holi dans le département du Plateau au Bénin, est une maladie à tropisme essentiellement cutané qui touche principalement les enfants de moins de 15 ans. Malgré sa découverte il y a plus d'un siècle et sa propagation depuis les années 1980, l'UB reste l'une des maladies infectieuses tropicales les plus négligées. C'est la troisième mycobactériose dans le monde après la tuberculose et la lèpre [1]. La plupart des cas sont signalés en Afrique de l'Ouest, et le Bénin est l'un des pays les plus endémiques. Cette infection est caractérisée par des lésions cutanées indolores entraînant des cicatrices, déformations, amputations, et des incapacités si elles ne sont pas traitées [1].

L'une des principales caractéristiques épidémiologiques de cette maladie est la distribution des cas dans les foyers très bien délimités. Elle sévit généralement dans les communautés rurales pauvres ne disposant pas d'eau potable ou d'infrastructures de traitement de l'eau à certains endroits [2-5]. Les résultats d'études épidémiologiques de terrain ont montré une association directe entre l'infection à *Mu* et les zones marécageuses, et ont permis d'identifier les milieux aquatiques comme le principal réservoir du bacille, comme pour la plupart des mycobactéries environnementales. Dans ce contexte, le principal facteur de risque identifié à ce jour est le contact étroit avec une source d'eau non protégée (par exemple, rivières, lacs, zones marécageuses). Ces sources d'eau à écoulement lent ou stagnant abritent divers organismes aquatiques, conduisant probablement à une contamination humaine par piqûres, bien que ce scénario n'aboutisse encore à un consensus et n'exclut pas d'autres modes de transmission possibles [2, 6-9]. Il a également été suggéré que l'urbanisation pourrait entraîner une réduction du risque d'infection par *Mu* en réduisant l'accès à l'eau non protégée ou en fournissant un accès plus facile à des sources d'eau protégées [10, 11].

Depuis 2010 à ce jour, le nombre de nouveaux cas rapportés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ne cesse de diminuer dans les principales zones endémiques dans le monde en l'occurrence en Afrique par ricochet au Bénin, à l'exception de l'Australie [12]. Malgré que de nombreuses hypothèses ont été émises [13-15], il n'existe pas de données factuelles à notre connaissance pour expliquer cette diminution. Ces facteurs peuvent différer d'une région à une autre, et pourraient être de type environnemental, socio-économique et comportemental. L'identification de ces facteurs protecteurs contre l'ulcère de Buruli est cruciale pour la prévention et le contrôle de cette maladie.

Le développement de mesures préventives adaptées requiert le développement d'une approche

globale intégrant une meilleure connaissance des comportements humains.

Le but de la présente thèse est d'étudier les facteurs environnementaux et anthropiques modifiant l'incidence de la maladie afin de proposer des mesures préventives adaptées contre l'infection à *Mu*.

Cette thèse est articulée autour de trois axes à savoir : (i) les facteurs de risque comportementaux associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli par la réalisation d'étude épidémiologique cas-témoins des patients d'UB confirmés par PCR du Centre de Dépistage et de Traitement de la Lèpre et de l'Ulçère de Buruli (CDTLUB) de Pobè au Bénin , (ii) La répartition spatiale de *Mycobacterium ulcerans* dans l'environnement par la réalisation d'étude environnementale et (iii) l'interaction entre l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mycobacterium ulcerans* par la triangulation des résultats d'études épidémiologique, environnementale et de la géographie de santé.

## **Chapitre 1. Synthèse bibliographique et fondements théoriques**

## **1.1 Etat des connaissances sur l'ulcère de Buruli**

### **1.1.1 Définition**

L'UB est une maladie infectieuse causée par *Mu*. La maladie est caractérisée par une nécrose étendue du tissu sous-cutané qui, si elle n'est pas traitée, entraîne des séquelles invalidantes [16]. L'UB est une infection cutanée humaine due à une mycobactérie présente dans l'environnement [12, 17]. L'infection conduit souvent à une destruction étendue de la peau et des tissus mous, avec formation d'ulcérations importantes. Elle est à l'origine d'importantes incapacités fonctionnelles même si elle n'entraîne que peu de décès.

### **1.1.2 Histoire d'une maladie cutanée mystérieuse**

La première description des ulcères cutanés chroniques correspondant à la pathologie de l'infection à *Mu* remonte à la fin du XIXe siècle, lorsque le médecin britannique Albert Cook a décrit ses observations dans The Mengo Hospital notes, conservé à la bibliothèque de l'hôpital de Kampala, en Ouganda [18]. En 1948, dans un article publié, MacCallum, bactériologiste australien et ses collègues, décrivent six cas d'ulcères cutanés à bords décollés, observés à Bairnsdale dans le sud-est de l'Australie [19]. Les caractéristiques des ulcères décrits sont similaires à celles décrites par le Dr Albert Cook. Un examen microscopique des tissus de ses patients, avait permis de mettre en évidence de nombreux bacille acido-alcool-résistant (BAAR). C'est cette nouvelle espèce de bacille acido-alcool-résistant (BAAR), qui sera peu après nommée *Mu* en raison des lésions ulcérotives qu'il provoque [19]. Il convient de noter que le premier isolement en culture a été obtenu par une incubation accidentelle de la culture dans un incubateur défectueux [20], révélant la faible température de croissance pathogène de 30 – 33 °C. Cette préférence de température est considérée comme le principal facteur du tropisme cutané et la dissémination systémique limitée des infections à *Mu*.

De nombreux cas atteints de cette nouvelle mycobactériose sont décrits en Afrique de 1940 à 1950. En République démocratique du Congo, une grande série de cas de 170 patients atteints d'ulcères cutanés nécrotiques ont été décrits [21]. En Ouganda, 40 patients ont été rapportés par Clancey, dont 28 proviennent du district de Buruli, la même région que les premiers cas décrits 60 ans plus tôt par Cook [22, 23].

Une forte prévalence d'infections à *Mu* a été constatée dans les années 1950 et 1960 dans ce district de Buruli, alors faiblement peuplé, près du Nil en Ouganda et, par conséquent, la maladie est devenue plus généralement connue comme UB [22-24].

À proximité de cette première infection, dans les années 1960-1970, une importante épidémie est survenue dans un camp de réfugiés rwandais en Ouganda qui a été ouvert en 1964, toujours

dans la région de Buruli, à proximité du Nil [12]. Une enquête approfondie sur les 220 cas d'UB rapportés jusqu'à 1969 [5, 12], lorsque la Communauté a déménagé dans une nouvelle localité, où le nombre de cas a diminué, a fourni une grande partie des connaissances de base sur l'épidémiologie de l'UB qui est encore valable aujourd'hui.

Par la suite, depuis les années 1980, il y a eu une augmentation spectaculaire des cas dans le monde et de nombreux pays sont également touchés par cette maladie, essentiellement en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale ainsi qu'en Australie et en Papouasie-Nouvelle-Guinée (PNG) [12, 25], alors que le foyer historique Ougandais s'est éteint définitivement depuis que ce camp de réfugiés n'existait plus.

### **1.1.3 Epidémiologie descriptive**

#### **1.1.3.1 Ampleur**

L'incidence réelle de l'UB dans les différents pays endémiques n'est pas connue et une faible notification de cas est suspectée dans certains pays, comme le Nigéria [26]. Le nombre de nouveaux cas d'UB déclarés par an, qui était à environ 10 000 cas dans les années 1990, a beaucoup diminué [27]. En 2015, 13 pays ont déclaré 2046 cas ; en 2016, il y a eu 1920 cas et en 2018, 14 pays ont déclaré 2713 cas d'ulcère de Buruli, contre 2129 en 2017; Le Ghana, l'Australie et le Nigeria ont signalé la plupart des cas [12, 16]. Les données disponibles sont limitées pour plusieurs raisons. Dans les pays endémiques où les cas sont signalés régulièrement, les activités de contrôle ont une portée géographique limitée, et les données peuvent ne pas refléter la réalité au niveau national. Il existe des zones où les activités de contrôle sont limitées ou inexistantes, et l'étendue de la maladie est donc relativement inconnue. La connaissance limitée de la maladie, sa répartition focale et le fait qu'elle affecte principalement les communautés rurales pauvres parfois difficile d'accès en saison de pluie, contribuent également à la faible notification des cas [12, 27].

#### **1.1.3.2 Répartition géographique**

Jusqu'à la fin du XXe siècle, les séries de cas d'UB ont été rapportées principalement dans les pays d'Afrique de l'Ouest et du centre, que sont le Congo [28], le Nigéria [29], la Côte d'Ivoire [30, 31], le Gabon [32], le Ghana et le Bénin [12]. Toutefois, des infections sporadiques de *Mu* se sont produites dans un certain nombre de pays complémentaires à climats tempérés totalisant jusqu'à 36 pays (Tableau 1). Ils sont répartis surtout dans les régions tropicales à climat chaud et humide en Afrique, en Amérique du Sud, en Asie et dans le Pacifique occidental [12, 33]. Pendant longtemps, l'UB affecte souvent les populations pauvres dans les zones rurales

éloignées et la prise de conscience limitée de la maladie a entravé la détection de foyers de nouvelle infection et donc le contrôle de l'UB.

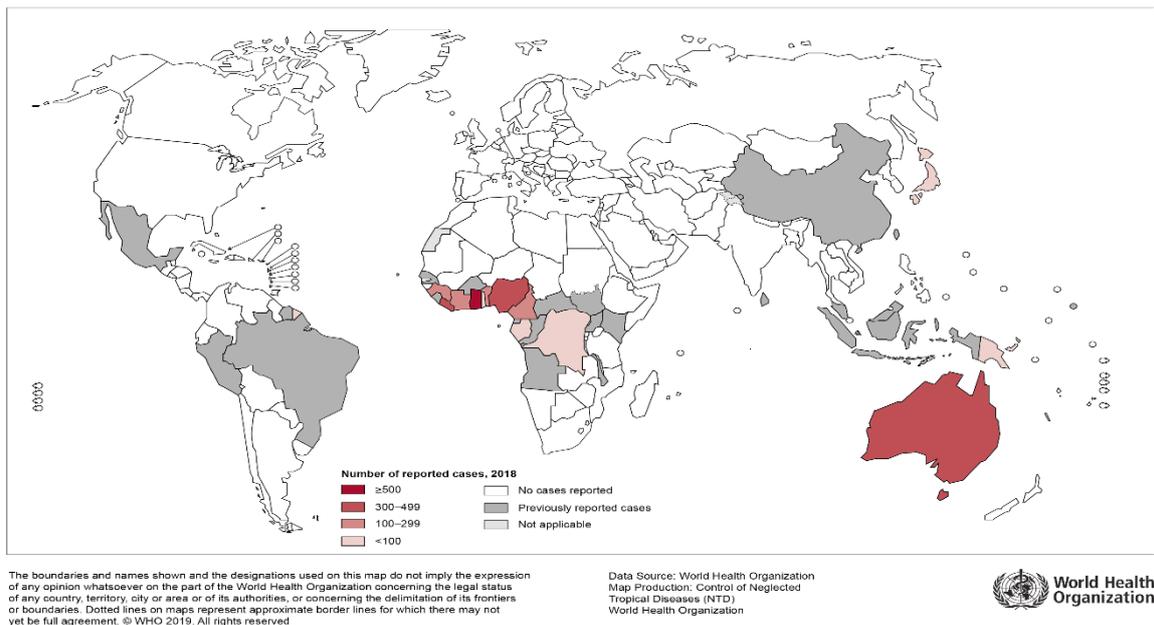
Selon le récent rapport de l'OMS, plus de 64 000 cas d'UB ont été signalés entre 2002 et 2018 dans plus de 20 pays en Afrique (Benin, Cameroun, RCA, Congo, Côte d'Ivoire, RDC, Guinée Equatoriale, Gabon, Ghana, Guinée, Liberia, Nigeria, Sierra Léone, Sud Soudan, Ouganda et Togo), en Amérique et en Asie-Pacifique dont 22223 cas en Côte d'Ivoire, 12813 au Ghana et 10472 au Bénin [34]. Le nombre de nouveaux cas d'UB semble diminuer dans la plupart des pays endémiques dans le monde, en Afrique en l'occurrence au Bénin mais pas en Australie (650 cas en 2017 et 2018) (Figure 1) [34].

**Tableau I : Pays ayant déjà déclaré un cas d'UB**

<b>Continent</b>	<b>Pays</b>
Amérique	Guyane française (foyer endémique le plus important du continent américain), Bolivie, Mexique, Pérou (forêt amazonienne), Suriname.
Afrique	Angola, Bénin, Burkina-Faso, Cameroun, Côte d'Ivoire, Congo, Gabon, Ghana, Guinée, Guinée équatoriale, Liberia, Malawi, Mali, Nigeria, Ouganda, RDC, RCA, Sénégal, Sierra Leone, Soudan, Togo.
Asie-Pacifique	Inde, Indonésie, Malaisie, Japon, Sri Lanka, Chine, Papouasie Nouvelle Guinée, Kiribati (Micronésie), Australie

*Source : OMS, 2020*

Distribution of Buruli ulcer, worldwide, 2018



**Figure 1: Répartition des cas d’ulcère de Buruli rapportés en 2018 dans le monde**  
Source : OMS, 2020

### 1.1.3.3 Hôte, répartition par âge et sexe

Il y a une variation considérable des aspects cliniques et épidémiologiques à l’intérieur d’un pays, mais aussi d’un pays à l’autre. L’homme semble être l’hôte définitif du *Mu*. Pour la majorité des auteurs, les enfants âgés de 5 à 14 ans sont les plus atteints. Toutefois, en Afrique, par exemple, environ 48% des sujets affectés sont des enfants de moins de quinze (15) ans, alors qu’en Australie ils ne représentent que 10% des cas et 19% au Japon [12]. On ne relève pas de différences importantes entre les hommes et les femmes [35, 36] mais l’UB atteint plus souvent les femmes que les hommes à l’âge adulte. Dans les zones endémiques, ce sont les femmes qui ont à charge les principales activités quotidiennes au contact des points d’eau non protégés. On retrouve souvent des groupes de cas autour d’étendues d’eau non protégées.

## 1.1.4 Epidémiologie analytique

### 1.1.4.1 Agent pathogène

En 1948, MacCallum en Australie a été le premier à isoler *Mu*, l’agent étiologique de l’UB en culture chez des patients. C’est une mycobactérie environnementale. La bactérie appartient à la famille des bactéries responsables de la tuberculose et de la lèpre. Il appartient au groupe III de la classification de Runyon (Tableau 2) des mycobactéries atypiques [37]. Comme l’ensemble des mycobactéries, *Mu* possède une paroi riche en lipides, caractéristique des bacilles alcool

acido-résistants, qui lui confère une grande résistance aux substances antimicrobiennes. Toutefois, contrairement aux autres mycobactéries, les agrégats de *Mu* sont recouverts d'une matrice extracellulaire riche en glycophospholipides. Cette matrice est le réservoir d'une toxine, la mycolactone, principal facteur de virulence connu à ce jour, responsable des lésions tissulaires et inhibe la réponse immunitaire. Des recherches sur les réservoirs potentiels de *Mu* sont en cours. La lenteur de la croissance de *Mu* (temps de doublement > 48 h) associée à sa faible densité pose des difficultés particulières pour la récupération de la bactérie en culture à partir d'échantillons environnementaux [38]. Il existe des techniques de biologie moléculaire : Polymerase Chain Reaction (PCR) qui permettent une détection rapide et précise de l'ADN de la bactérie dans les différents échantillons. Par des techniques avancées de biologie moléculaire, plusieurs souches correspondant à des origines géographiques différentes ont pu être isolées [39].

**Tableau II : Classification selon Runyon des mycobactéries en fonction de leur groupe**

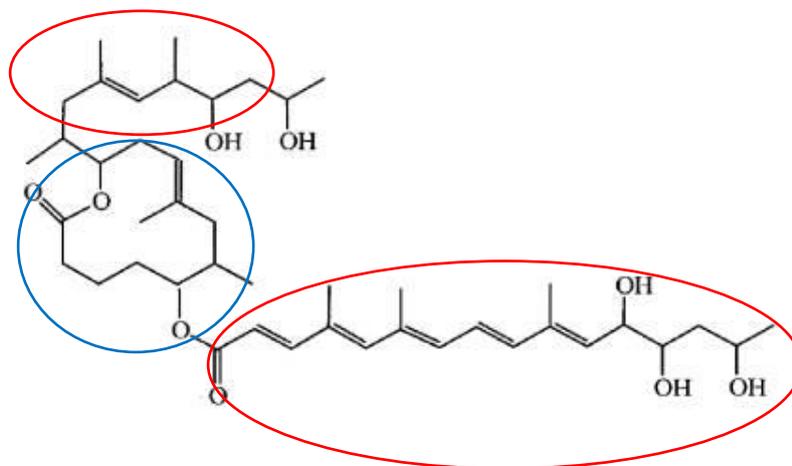
<b>Groupes</b>	<b>Mycobactéries atypiques</b>
<b>I. Photochromogène</b>	
- Croissance lente	<i>M. kansasii</i>
- Pas de pigmentation à l'obscurité	<i>M. marinum</i>
- Pigment jaune après exposition à la lumière	
<b>II. Scotochromogène</b>	
	<i>M. scrofulaceum</i>
- Croissance lente	<i>M. flavescens</i>
- Produisent toujours un pigment jaune orangé à l'obscurité et à la lumière	<i>M. gordonae</i>
	<i>M. sulgai</i>
<b>III. Non photochromogène</b>	
	<i>M. alvium intracellare</i>
- Croissance lente	<i>M. simiae</i>
Les colonies jeunes ne sont pas pigmentées	<i>M. xenopi</i>
	<b><i>M. ulcerans</i></b>
	<i>M. terrae</i>
	<i>M. gastri</i>
<b>IV. Mycobactérie à croissance Rapide</b>	
	<i>M. fortuitum</i>
	<i>M. chelonae</i>

Source : *Médecine Tropicale 1995 : 55, 363-373 [40]*

#### **1.1.4.2 La mycolactone et l'ulcère de Buruli**

D'après leur observation des zones nécrotiques autour des foyers bactériens de l'ulcère de Buruli, Connor et ses collaborateurs ont été les premiers, en 1965, à suggérer que *Mu* peut

produire une cytotoxine diffusible [41]. Cette hypothèse a été confirmée plus tard par des études ayant consisté à injecter des filtrats de culture de mycobactéries dans la peau de cochons d'inde, montrant que cela provoque une nécrose focale semblable à celle des infections humaines naturelles [12, 41-43]. En 1999, George et al. ont réussi à isoler un facteur cytotoxique de *Mu* et déchiffré sa nature chimique [44]. La toxine de *Mu* fut nommée mycolactone, basée sur son origine mycobactérienne et sa structure de macrolactone (Figure 2). Des études réalisées plus tard ont révélé que la mycolactone dérivée de *Mu* était en réalité un mélange de deux stéréoisomères appelés A et B [45, 46]. Depuis la découverte initiale de la mycolactone A / B, huit congénères de mycolactone supplémentaires ont été identifiés, soient produits par des souches de *Mu* de différentes origines géographiques ou pathogènes génétiquement apparentées des poissons et des grenouilles, initialement appelés *Mycobacterium pseudoshottsii* et *Mycobacterium liflandii*. L'analyse comparative des génomes a révélé plus tard que toutes les mycobactéries productrices de mycolactone ont évolué à partir d'un pro géniteur semblable à *Mycobacterium marinum* [47]. Il a été observé une conservation de la structure centrale et de la chaîne latérale supérieure des macrolides. De plus, les populations de mycolactone de différentes sous-lignées de *Mu* varient en longueur, en nombre et en localisation des groupes hydroxyle et en nombre de doubles liaisons de la chaîne latérale inférieure. Ces changements entraînent des modifications prononcées de la cytotoxicité [48-50]. L'origine et la chimie des mycolactones naturelles, les relations de sa structure-activité et de différentes approches développées pour générer des mycolactones synthétiques ont été examinées récemment [51, 52].



**Figure 2: Structure de la mycolactone A/B**

Le corps lactone (avec la fonction ester R-COO-R) en bleu et les 2 chaînes carbonées en rouge

### 1.1.4.3 Ecologie et mode de transmission

Le mode exact de transmission de l'ulcère de Buruli a longtemps échappé aux scientifiques et demeure encore inconnue. Toutefois, malgré que le mode de transmission de *Mu* n'est pas encore élucidé, il est généralement supposé que l'infection se produit par l'inoculation de la bactérie dans la peau par un traumatisme direct ou des piqûres d'insectes tels que des punaises d'eau ou des moustiques par exemple [53, 54].

Les études ont permis de constater que les foyers endémiques s'organisent presque toujours autour des écosystèmes aquatiques des régions humides tropicales ou subtropicales. Toutes les études épidémiologiques montrent que les bouleversements environnementaux (déforestations, création de zones humides) favorisent l'expansion de la maladie [3, 29, 55, 56]. Elles montrent également qu'il n'y a pas de transmission inter humaine et l'homme se contaminerait au contact de l'environnement aquatique [30, 57-60].

La transmission humaine est probablement directe transcutanée à partir du réservoir hydro-tellurique. De nombreuses hypothèses sont émises pour expliquer cette transmission qui semble se dérouler à travers plusieurs mécanismes [61, 62]. La bactérie présente à la surface de la peau pourrait être introduite dans les tissus sous-cutanés par divers traumatismes (injections, morsures, blessures par explosions de mine ou armes à feu). Des bacilles viables ont été détectés dans la salive des punaises aquatiques de la famille des Naucoridae et des Belostomatidae [63] (Photo 1), qui pourraient ainsi transmettre la maladie par piqûre [64]. Ces insectes sont des carnivores capables de piquer l'homme. Cependant leur importance dans l'écologie de *Mu* reste méconnue et difficile à explorer en raison du manque de connaissances sur la biologie de ces insectes. Récemment, des signatures moléculaires de *Mu* ont été détectées dans les tissus de punaises aquatiques en dehors de leur environnement aquatique. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle, par leur comportement migratoire, les punaises aquatiques contribueraient à la dissémination du bacille, ainsi qu'à sa transmission, hors de l'environnement aquatique [65-69]. Le rôle de la contamination de certaines espèces de poissons se nourrissant d'insectes ou de larves a été également évoqué. Ces poissons se contamineraient lors de leur repas et ils deviendraient des hôtes passifs de *Mu* [70]. D'ailleurs, la même année, de nombreux éléments de la chaîne trophique ont été retrouvés positifs [71, 72]. En 2008, une étude réalisée au Ghana confirme la présence de *Mu* chez de nombreux animaux aquatiques. Depuis les années 1970, il est évoqué que les plantes aquatiques joueraient un rôle dans l'écologie du bacille [73]. D'après les résultats d'expériences in vitro, *Mu* est capable de former des biofilms à la surface de plantes

aquatiques, comme beaucoup d'autres bactéries et mycobactéries environnementales. Le biofilm confère une meilleure résistance vis-à-vis des agressions dans le milieu et une amélioration de croissance [68]. En plus de cela, on observe une augmentation de croissance de *Mu* après l'addition d'extraits d'algues dans le milieu de culture [74]. Tous ces résultats suggèrent l'existence de relations étroites entre le bacille et les plantes aquatiques. Une récente étude environnementale ponctuelle a permis de détecter également la présence de *Mu* à la surface de feuilles de plantes aquatiques.

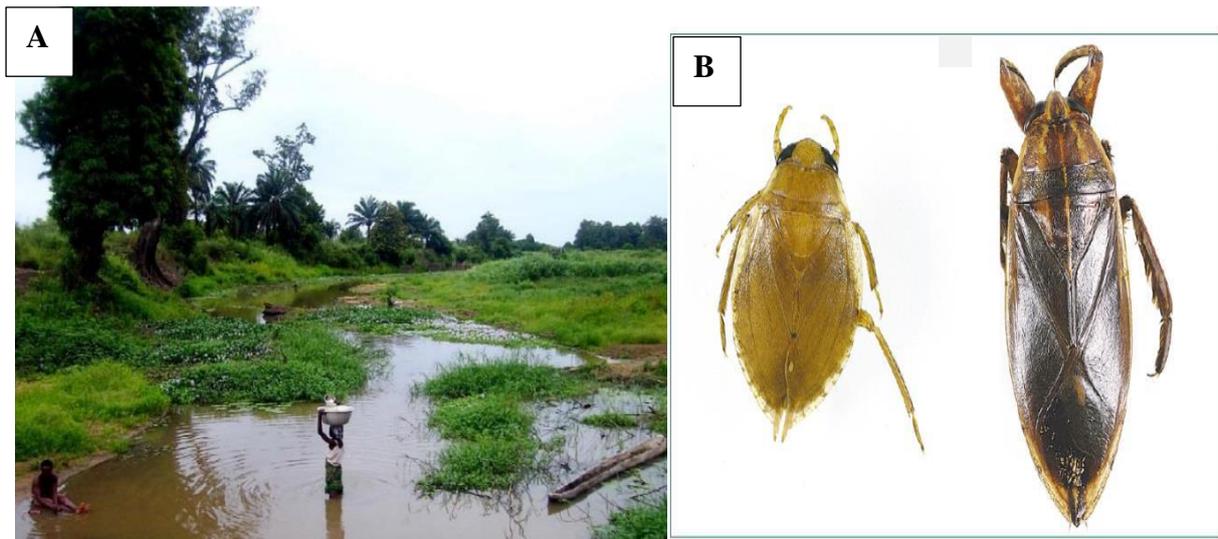
Certaines infections expérimentales d'escargots tropicaux ont montré qu'ils peuvent être des hôtes transitoires de *Mu*. En effet, les mollusques (escargots par exemple) sont connus pour héberger de nombreux microorganismes, qui se nourrissent principalement de végétaux aquatiques. Des bacilles ont été en effet retrouvés uniquement dans le tube digestif et les fèces des mollusques après ingestion de plantes aquatiques, support d'un biofilm de *Mu*. Toutefois, d'après les résultats de ces expérimentations, quelques semaines plus tard, les bacilles ne sont plus détectables dans l'organisme et aucune multiplication du bacille n'a été observée dans les tissus de ces animaux [72]. Malgré que Mosi et ses collègues en 2008 ont confirmé partiellement le rôle des punaises aquatiques en montrant que les Belostomatidae (une famille de punaises aquatiques) étaient capables de transmettre le bacille par piqûre à leur proie [75]. Le rôle des punaises aquatiques comme vecteur de *Mu* est vivement contesté par certaines équipes [69, 76]. Cependant, jusqu'à l'heure actuelle, aucune autre hypothèse de transmission en Afrique n'a été démontrée en s'appuyant sur des preuves expérimentales et/ou environnementales. Contrairement à l'Australie où toute une autre description de l'écologie du bacille est avancée, faisant intervenir les moustiques et les mammifères terrestres.

Au regard de toutes les études réalisées jusqu'à présent en Afrique sur l'écologie et le mode de transmission de *Mu*, un modèle d'écologie et de transmission de *Mu* en Afrique, d'abord émis partiellement par le Pr. Portaels, puis repris et complété par le Dr. Laurent Marsollier, a été proposé comme suit : *Mu*, se développant probablement sous forme de biofilm sur des plantes aquatiques, peut se disséminer passivement dans la chaîne trophique en passant dans de nombreux hôtes intermédiaires, tels les poissons, les mollusques et autres invertébrés aquatiques, lesquels sont ensuite consommés par des punaises aquatiques carnivores (Figure 3 et Photo 1) [67]. Des études épidémiologiques en Afrique n'ont pas permis de détecter *Mu* chez les insectes (stades larvaires et adultes), alors que les mêmes études, sur les mêmes sites, ont montré que 8 % des punaises aquatiques présentaient des signatures moléculaires de *Mu* [77]. En Australie, les études suggèrent une écologie de la bactérie probablement différente de celle

de l'Afrique. Il n'a jamais été retrouvé de petits mammifères porteurs du bacille de façon symptomatique ou asymptomatique lors de captures dans l'environnement en Afrique. D'après les résultats de l'étude réalisée en Ouganda, parmi 700 rongeurs capturés, certains présentaient une mycobactériose, mais qui n'était pas provoquée par *Mu* [78]. Il en est de même pour 626 rongeurs et 222 musaraignes capturés au Bénin [79]. Plus généralement, en Afrique, *Mu* n'a encore jamais été détecté dans les tissus des animaux terrestres. Par contre en Australie, plusieurs mammifères ont présenté une infection à *Mu*. C'est le cas de mammifères domestiques, comme un chat, deux chevaux et quatre chiens [80-82] et d'animaux sauvages, comme des koalas et des opossums [83]. Lors d'une étude se concentrant sur les opossums, réalisée dans une zone endémique en Australie [83], *Mu* a été détecté dans les fèces de ces animaux et certains d'entre eux présentaient une infection cutanée à *Mu*. Toutefois, la question de leur mode de transmission fait énormément débat du fait que les opossums sont des arboricoles (se nourrit essentiellement de feuilles, fruits et de fleurs). Il se pourrait donc que ces animaux se contamineraient soit par ingestion lors de leur repas, expliquant la présence du bacille dans les fèces, soit par piqûre de moustiques, expliquant les lésions cutanées. Cette étude admet en effet que les moustiques sont un vecteur du bacille [83, 84]. En Australie, la bactérie est donc capable de coloniser des mammifères, principalement les opossums [83]. De plus, les résultats des études australiennes [85-87] suggèrent que le moustique serait le principal vecteur, mais, contrairement à d'autres arthropodes, il n'a jamais été démontré que le moustique était impliqué, par piqûre, dans la propagation des bactéries, sauf pour le phlébotome. En se basant sur la détection de l'ADN de *Mu* par PCR [12, 85], le portage du bacille par certaines espèces de moustiques a été démontré. Mais, la bactérie n'a plus été détectée par PCR à partir du stade adulte [86, 87] réduisant ainsi la probabilité pour ce dernier d'être un vecteur de *Mu*.

Les nombreuses études réalisées en Australie jusqu'à ce jour, indiquent que les larves de moustiques peuvent servir d'hôte transitoire de la bactérie et participer ainsi à son maintien dans la chaîne trophique dans le milieu aquatique. Ce rôle que joueraient les larves de moustiques dans la transmission de l'UB en Australie, pourrait s'expliquer par le fait que les larves se contamineraient en se nourrissant à la surface des végétaux (aspiration de phytoplanctons, bactéries et matières organiques). Ces larves contaminées, étant des proies pour les punaises aquatiques permettraient la colonisation du bacille dans les glandes salivaires des punaises aquatiques [75]. Par contre, le rôle des punaises aquatiques dans la transmission de *Mu* évoqué en Australie reste à démontrer.

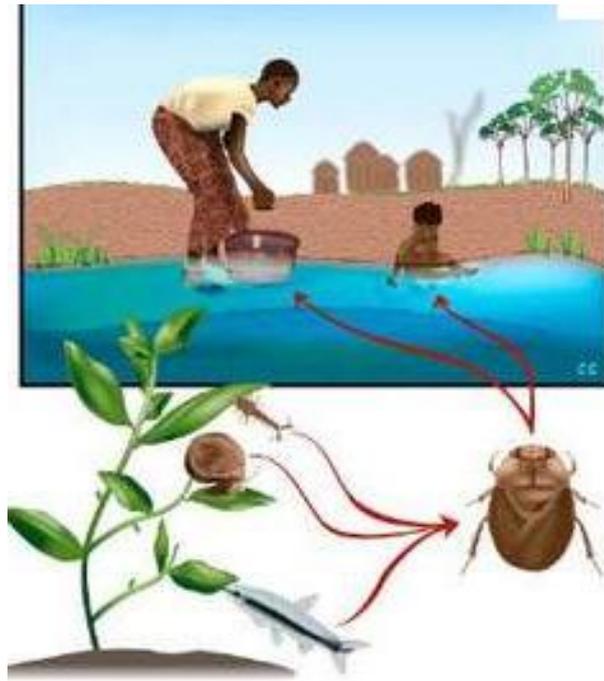
Malgré que les situations Africaines et Australiennes soient difficilement comparables, du fait des modes de vie des populations, du climat, de la faune et la flore, le modèle de transmission de *Mu* suggéré en Australie, proposant un réservoir terrestre où les mammifères seraient les hôtes de la bactérie (Figure 4) serait différent à cause des différents environnements de vie de celui Africain (Figure 3). En dehors des deux modèles de transmission suggérés en Afrique et en Australie, un cas d'infection à *Mu* après morsure humaine a été rapporté dans la littérature [88].



**Photo 1:** Zone d'endémicité et vecteurs possibles de transmission de *Mu*  
(A) Zone d'hyperendémicité typique, Bénin

(B) Punaises d'eau *Naucoris flavicolis* (taille 1.5cm, à gauche) et  
*Belostoma cordofna* (taille 10 cm, à droite), vecteurs probables de *Mu*

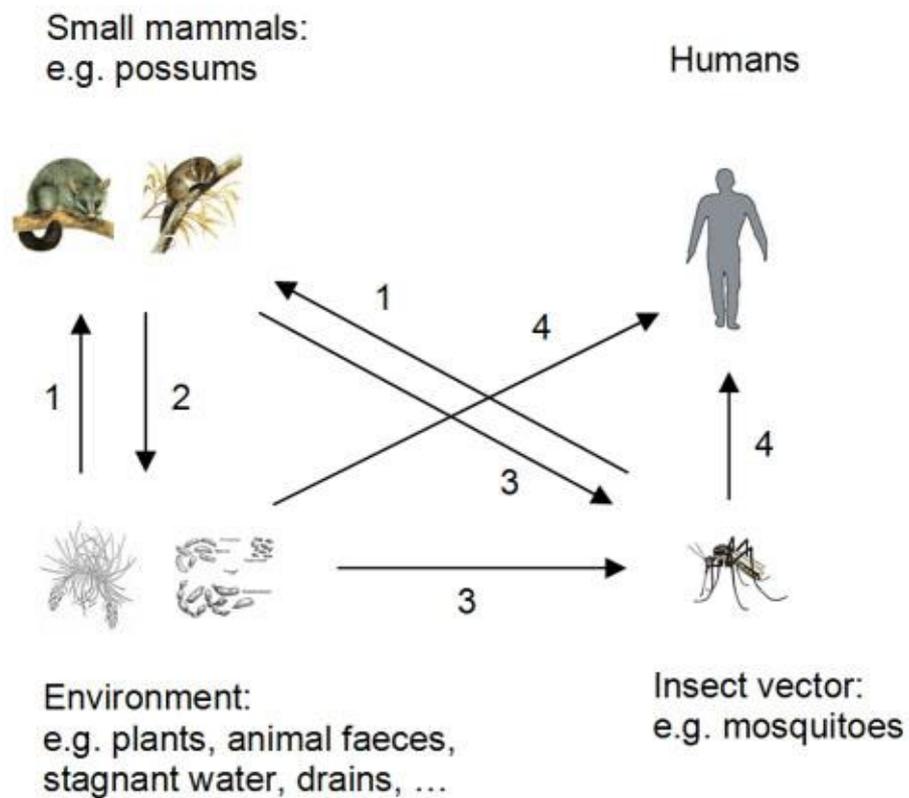
**Source :** Adapté de [89, 90]



**Figure 3 :** Modèle de l'écologie et de la transmission de *Mu*

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

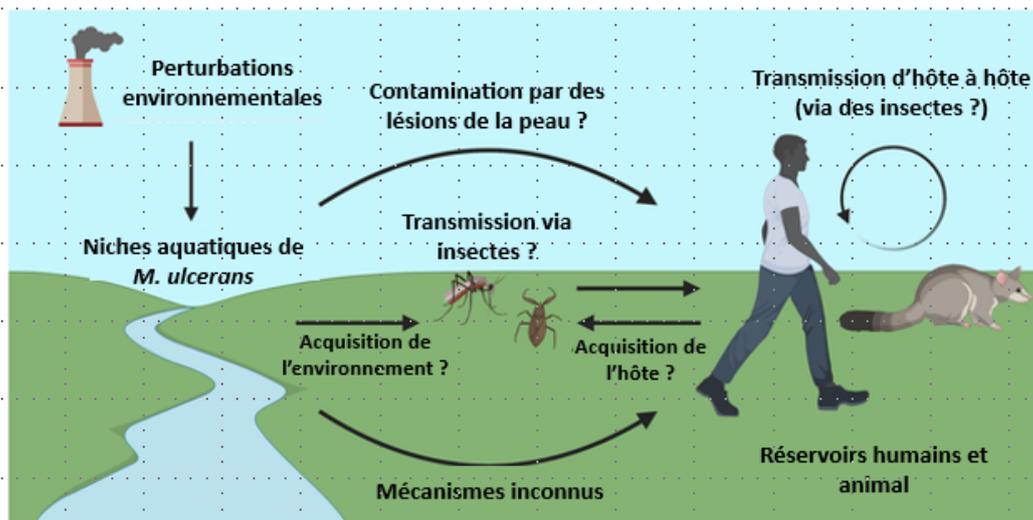
*Source : Marsollier et al., 2007 [67]*



**Figure 4 : Modèle de transmission de *Mu* entre l'environnement, les moustiques, les opossums et les humains en Australie.**

Les opossums ingèrent *Mu* dans l'environnement ou sont infectés par un insecte vecteur. Les opossums sont des hôtes de *Mu* et le disséminent dans l'environnement (les opossums ne sont pas des animaux que l'on retrouve sur le continent Africain). Les moustiques sont contaminés par *Mu* après contact avec un opossum contaminé ou un environnement contaminé. La bactérie est transmise à l'homme par piqûre de moustiques et/ou par contact direct avec un environnement contaminé.

**Source :** Fyfe et al., 2010 [83]



**Figure 5 : Proposition de modèle de mécanisme de la transmission de *Mu***

**En Afrique :** Ce modèle suggère que les mollusques ou poissons se contamineraient au cours de leur repas sur les plantes aquatiques portant le biofilm de *Mu* [74]. La punaise aquatique carnivore se contamine en mangeant le mollusque ou poisson et l'homme pourrait se contaminer par piqûre de la punaise au cours de ses activités en milieu aquatique [66-68].

**En Australie:** Il est basé sur les résultats de détection de *Mu* en zone endémique en Australie : *Mu* serait une zoonose en provenance des marsupiaux et transmise, soit par les moustiques, soit par contact avec les fécès [83, 85]. La transmission directe entre les opossums et les humains n'est pas assez documentée actuellement. Toutefois, la transmission entre les insectes (moustiques) et les humains est prouvée.

La transmission des hémiptères aquatiques vers les mammifères est démontrée au laboratoire sur un modèle de souris, mais il est difficile de documenter la survenue de ce mécanisme dans les zones endémiques.

*Source : d'après Muleta et al., 2021*

#### 1.1.4.4 Saisonnalité de la transmission

L'interprétation des fluctuations saisonnières de l'incidence de l'UB est compliquée à cause de nombreux facteurs pouvant l'expliquer, y compris la période d'incubation de l'infection et le manque de connaissances sur le mode de transmission. Par conséquent, le moment de l'infection, à moins que le patient n'ait visité une zone endémique seulement une fois et pendant une courte période, est très complexe à déterminer avec précision. L'une des approches plus crédibles d'estimer le temps d'exposition et par ricochet la période d'incubation serait de bien documenter les cas d'UB parmi les visiteurs à court terme aux zones endémiques représentant

ainsi une source unique pour son estimation. Lors d'une étude réalisée dans le Sud-Est de l'Australie, à Victoria, cette approche a été utilisée par l'identification systématique des patients atteints d'UB ayant fait une seule visite d'exposition à l'une des zones endémiques bien connues. Les résultats de cette étude révèlent que la période d'incubation moyenne déterminée pour les patients infectés à Victoria était de 4,5 mois avec une grande variation de 32 à 264 jours [91, 92]. A Daintree, dans la région de l'extrême nord du Queensland où le climat est un climat tropical, un pic important de cas d'UB a été observé en septembre et octobre 2011. Ce pic est survenu, 7 à 8 mois après une saison des pluies exceptionnellement longue et très humide avec des précipitations de février 2011 qui étaient soupçonnées d'être liées à l'occurrence de l'infection [93]. De 2009 à 2015, la plupart des cas d'UB dans le Queensland ont été diagnostiqués pendant la saison sèche de juillet à novembre, ce qui s'expliquerait probablement par une augmentation de la transmission pendant la saison humide [93]. On remarque ainsi que la période d'incubation est plus longue en Queensland par rapport à Victoria. Dans le camp de réfugiés de Kinyara en Ouganda, la période entre les courts séjours des visiteurs et le développement d'UB a été estimée entre 1 et 3 mois [94]. Ces différences apparentes pour la période de l'incubation moyenne peuvent être dues au mode de transmission et la dose d'inoculation de *Mu*. En Guyane Française par exemple, *Mu* s'est avéré être en corrélation avec les régimes de précipitations à court terme (6 mois) et à long terme (une décennie). Au Japon, environ 80 % des cas d'UB signalés ont été diagnostiqués au cours de l'automne et l'hiver, indiquant la contraction de l'infection pendant ou peu de temps après la saison chaude et pluvieuse en été [95].

L'analyse des tendances saisonnières de l'infection à *Mu* est particulièrement difficile pour les régions endémiques en Afrique, où de très longs retards dans la notification des cas aux programmes nationaux de lutte contre l'UB doivent être également pris en compte. En plus de ces problèmes rencontrés, plusieurs études évaluant les tendances saisonnières de l'UB en Afrique ont utilisé des données nationales, en ignorant les différences locales dans les régimes de précipitations [1].

Au Cameroun par exemple, dans une étude évaluant les tendances saisonnières de l'UB dans une zone d'endémie, le nombre de cas entre 2002 et 2012 a culminé en mars. En supposant un délai entre l'infection et le diagnostic de 5 à 6 mois, cela suggère que le risque de l'infection est le plus élevé pendant la haute saison des pluies des mois d'Août à Octobre [96]. Des résultats similaires ont été rapportés pour la transmission dans le camp de réfugiés de Kinyara qui a été plus grande de juillet à septembre [94].

Toutes ces études ont montré que l'intervalle de temps entre l'exposition, le début des symptômes et le diagnostic d'UB peuvent varier considérablement d'un pays à un autre, d'une région à une autre et d'un individu à l'autre dans un même pays ou région, ce qui pourrait masquer des variations saisonnières distinctes dans l'intensité de transmission.

Les variations saisonnières de l'incidence d'UB peuvent ainsi résulter de différences dans la présence de l'agent pathogène ou vecteurs potentiels, ainsi que des comportements associés aux variations dans l'exposition des populations à *Mu*. Ces variations peuvent être déclenchées par les conditions climatiques et la dynamique des paysages, ainsi que par les changements saisonniers dans les activités agricoles et autres liées aux usages de l'eau qui intensifient l'exposition [1].

A la lumière de toutes les études épidémiologiques et environnementales réalisées, associant l'endémicité de l'ulcère de Buruli avec les écosystèmes aquatiques, l'un des principaux facteurs de transmission accrue pourrait être les inondations et l'apparition saisonnière de masses d'eau temporaires stagnantes et marécages, fournissant un terrain fertile pour les réservoirs / vecteurs potentiels et / ou agent pathogène lui-même.

#### **1.1.4.5 Mécanisme étiopathogénique de l'infection à *Mycobacterium ulcerans***

Lorsque *Mu* se retrouve dans le derme ou le tissu sous cutané, il y a une période de latence pendant laquelle le germe pousse lentement, prolifère graduellement, suffisamment pour élaborer une toxine qui détruit les tissus. La nécrose en l'occurrence des tissus gras doit fournir un milieu favorable pour la prolifération rapide de *Mu* accélérant ainsi la nécrose et éventuellement produisant un nodule cliniquement apparent, entraînant un effondrement de l'immunité à médiation cellulaire. Le test à la buruline à ce stade est négatif [12, 36]. A la guérison, en l'absence de preuves d'anticorps circulants dirigés contre l'exotoxine, la multiplication des bactéries pourrait cesser soit faute de nutriment, soit par action immunitaire cellulaire. En ce moment, les tests cutanés sont positifs et suggèrent ainsi une réponse immunologique de l'hôte aux composantes antigéniques de la mycobactérie [12, 36].

#### **1.1.4.6 Facteurs de risque et prévention de l'ulcère de Buruli**

D'après la littérature, les facteurs de risque de la maladie sont multiples et pas tous documentés à ce jour. L'existence d'au moins un point d'eau à proximité du village et fréquenté par les habitants, semble être le principal facteur de risque de la maladie. Ainsi, les foyers endémiques sont plus souvent situés en milieu rural, près de rivières, de lacs ou de marécages. Elle semble également émerger dans les zones où ont été créés des aménagements de territoire, tels que des

barrages hydroélectriques (par exemple le cas du lac de Kossou dans le centre de la Côte d'Ivoire) servant à la production d'électricité et à l'exploitation agricole [97].

- **Facteurs de risque comportementaux**

Il ressort des résultats de ces recherches, que le défaut de ne pas porter des vêtements de protection [7, 98] et les activités à proximité de certaines sources d'eau non protégées [7-9, 12, 99-102] constituent des facteurs de risques comportementaux de contracter l'UB. Par contre, le fait de porter des vêtements de protection [7, 8, 103, 104], de prendre soin des plaies [7, 8, 103, 104] et une bonne hygiène [99, 104] ont été identifiés comme facteurs conférant un certain degré de protection. Dans le sud-est de l'Australie, où une implication des moustiques dans la transmission des infections à *Mu* comme des vecteurs biologiques ou purement mécaniques de l'agent pathogène a été suggérée, les piqûres de moustiques ont été identifiées comme un facteur de risque. En plus d'utiliser des insecticides répulsifs, le nettoyage immédiat des plaies a également été associé à une diminution de risque de contracter cette infection [103]. En Afrique, les piqûres d'insectes, mais aussi des coupures et des éraflures près des plans d'eau ont été associées à une augmentation du risque d'infection [99]. De plus, une des études cas-témoins est arrivée à la conclusion qu'une bonne connaissance de l'UB et des facteurs de risque d'infection avait un effet protecteur [100].

- **Prévention**

Il n'existe pour l'instant aucune mesure de prévention primaire pouvant être appliquée à cause du mode de transmission inconnu. La prévention repose alors sur l'utilisation des moustiquaires, le lavage fréquent des vêtements et les soins des plaies avec des solutions antiseptiques [105]. Les résultats de recherche montrent que l'incidence de la maladie diminue chez les enfants vaccinés par le BCG. L'efficacité de la vaccination BCG a aussi été démontrée dans la prévention des complications osseuses. Un autre outil de prévention est l'éducation sanitaire qui vise à la mise en garde des populations rurales au risque de contamination par le milieu hydro-tellurique lors de la fréquentation des points d'eau [105]. Enfin, les résultats d'une étude récente sur l'accès et l'utilisation de l'eau de forage pour les activités quotidiennes montrent clairement une diminution de l'incidence de l'UB ouvrant de nouvelles possibilités pour développer une stratégie efficace de prévention contre l'UB [2].

La question de la prévention reste ainsi largement ouverte et représente l'une des priorités de recherche sur le plan mondial et ce sera l'un des axes de ce travail de thèse.

- **La co-infection entre l'ulcère de Buruli et le VIH**

La co-infection entre l'UB et le VIH n'est pas rare en raison de la prévalence élevée du VIH dans de nombreuses zones endémiques (Cameroun, Côte d'Ivoire, RDC par exemple). Il n'est donc pas rare de retrouver des cas de co-infection VIH-UB. Mais jusqu'à aujourd'hui, les informations sur les données épidémiologiques et les relations cliniques entre les deux infections sont assez rares. Au Bénin par exemple, les résultats d'une étude cas-témoins ont permis de constater que la prévalence du VIH chez les patients atteints d'UB (2,6%) était significativement plus élevée ( $P = 0,003$ ) que celui de la population témoin locale (0,3%) [106]. Ces résultats confirmeraient ainsi l'hypothèse selon laquelle le VIH augmente le risque de contracter l'UB. Des résultats similaires ont été rapportés dans une autre étude cas-témoins réalisée au Ghana, avec 5% des patients atteints d'UB et 0,9% des témoins des personnes séropositives pour le VIH, même si cette association n'était pas statistiquement significative en raison du faible nombre de participants à l'étude [104]. De plus, la prévalence du VIH chez les patients atteints d'UB était significativement supérieure à celle de la prévalence d'autres patients ou femmes enceintes fréquentant les mêmes établissements de santé [107]. Selon certaines études, l'infection à VIH affaiblit le système immunitaire et semble également affecter la présentation clinique de l'UB. Les patients coinfectés ont ainsi tendance à avoir des lésions plus sévères et plus souvent des lésions multifocales que les patients à VIH négatifs [107, 108]. Ces résultats sont similaires à d'autres études qui rapportent également un certain nombre de cas de co-infection UB-VIH avec une progression agressive et multifocale des lésions de l'UB [109-114]. La gestion de la co-infection UB-VIH est difficile [115]. Il est recommandé que tous les patients atteints d'UB fassent l'objet d'un test de dépistage pour le VIH et qu'on administre un traitement antirétroviral précoce pour réduire le taux de mortalité chez les sujets atteints de la co-infection [12, 107-109, 111].

Il ressort de l'analyse des données disponibles dans la littérature sur la co-infection UB-VIH, que le VIH serait un facteur de risque pour l'UB et aggraverait les lésions de l'UB (lésions plus larges, lésions multifocales). L'OMS a donc publié sept recommandations clés visant à harmoniser la prise en charge de la co-infection UB-VIH :

- un test de dépistage pour le VIH devrait être pratiqué chez tous les patients atteints d'UB,
- une prophylaxie au cotrimoxazole devrait être immédiatement débutée chez tous les patients infectés par le VIH,

- un traitement antibiotique pour l'UB doit être introduit avant le début du traitement antirétroviral (ARV) et donné pendant 8 semaines.
- les ARV doivent être initiés chez tous les patients coïnfectés UB-VIH avec une infection symptomatique indépendamment de la numération des CD4 ou chez les patients asymptomatiques avec des  $CD4 \leq 500$ ,
- le traitement ARV devrait être introduit dès que possible dans les 8 semaines suivant le début du traitement de l'UB,
- tous les patients coïnfectés UB-VIH devraient être examinés activement pour la tuberculose avant de commencer le traitement UB et le traitement ARV,
- un système de suivi et de monitoring devrait être mis en œuvre pour surveiller et évaluer les résultats des interventions UB-VIH.

- **Facteurs socio-économiques de l'UB pour les patients et leurs familles**

Dans les pays développés à l'instar de l'Australie, le Japon et la Guyane Française, le diagnostic et la prise en charge des patients atteints d'UB sont assurés par des systèmes de santé universels bien dotés en ressources. Par contre, dans les pays en voie de développement et qui sont les plus endémiques, les ressources des systèmes de santé ne sont pas assez suffisantes pour les pathologies de première envergure comme le paludisme, le sida et la tuberculose [12]. Ainsi, très peu de ressources sont allouées aux maladies tropicales négligées dont la prise en charge dépend en grande partie des fonds alloués par les organisations internationales et les organisations non gouvernementales et fondations dont la Fondation Raoul Follereau [2, 12]. Bien que dans de nombreux pays endémiques, le traitement antibiotique de l'UB soit gratuit, d'autres dépenses et les efforts nécessaires peuvent empêcher les patients à recourir aux centres de traitement spécialisés en UB [12, 116]. Le plus gros fardeau économique auquel sont confrontés les patients est lié au transport, l'hébergement et la nourriture pour les patients et les garde-malades. Lorsque les patients doivent être hospitalisés pour de longs moments et qu'ils doivent également se faire accompagner par un garde-malade, cela entraîne une énorme perte de revenus et peut être trop contraignant pour les familles touchées surtout lorsqu'il s'agit de la mère au foyer [117, 118]. Ce qui aggrave davantage la situation sont les croyances culturelles, les perceptions concernant l'efficacité du traitement antibiotique de l'UB et la stigmatisation dérivée de l'origine mystique perçue de la maladie [119, 120]. Dans la plupart des zones d'endémie, les patients préfèrent consulter d'abord les guérisseurs traditionnels et ne faire recours aux centres de traitement spécialisés qu'en dernier recours lorsqu'il y a des complications osseuses [117]. Bien que l'UB soit une maladie à progression lente, les délais

pour recevoir un traitement adéquat sont préjudiciables au résultat du traitement. La prise en charge tardive des cas compliqués de l'UB peut également conduire à des séquelles invalidantes malgré la guérison.

Les résultats de nombreuses études réalisées dans les pays africains endémiques de l'UB ont révélé qu'il peut rendre les ménages pauvres, surtout lorsque les patients sont hospitalisés. L'isolement social des patients hospitalisés a été mentionné comme la principale cause d'abandon du traitement biomédical [120]. Dans une étude réalisée au Ghana, pour les patients de l'UB non hospitalisés, le transport et les autres coûts représentent 45% du revenu annuel des ménages. Pour ces patients non hospitalisés, l'isolement social était également un problème, en particulier pour les enfants, qui étaient souvent non accompagnés pour le traitement [121]. Au Nigéria, les résultats d'une récente étude révélèrent que les coûts avant qu'un diagnostic précis d'UB ne soit établi (y compris les coûts de médicaments, soins des plaies, hospitalisation, transport, nourriture et autres), représente le gros des coûts totaux du traitement de l'UB. Les coûts étaient catastrophiques pour 50% de tous les ménages touchés [122]. Face à ces constats, de nouvelles stratégies d'intervention socialement plus compatibles basées sur des faits issus d'études épidémiologiques de terrain sont cruciales et urgentes. Pour réduire par exemple, le retard aux soins tardifs, un système de diagnostic et de soins plus décentralisé, ainsi que l'amélioration de la mobilisation de la communauté et l'éducation des populations concernant l'UB sont nécessaires. Les résultats d'une récente campagne pilote de sensibilisation dans l'une des communes les plus endémiques du Bénin ont démontré l'utilité de telles interventions, reflétée par un fort soutien de la communauté et une augmentation spectaculaire de la détection de cas d'UB ayant été pris en charge immédiatement [116]. Cependant, le défi majeur de cette stratégie intégrée de lutte, sera la mobilisation de ressources à la fois financière et humaine (organisation, formation, personnel de santé, etc.) pour mettre en œuvre et maintenir des soins décentralisés à plus grande échelle et sur le long terme.

### **1.1.5 Diagnostic de l'ulcère de Buruli**

L'UB est caractérisé par une nécrose étendue du tissu sous-cutané qui, si elle n'est pas traitée, entraîne des séquelles invalidantes [34]. Elle est une infection cutanée humaine due à une mycobactérie présente dans l'environnement. C'est la mycobactériose la plus fréquemment rencontrée actuellement après la tuberculose et devant la lèpre dans un grand nombre de pays de la zone intertropicale [12, 34, 123]. L'infection à *Mu* conduit souvent à une destruction étendue de la peau et des tissus mous, avec formation d'ulcérations importantes. Malgré que l'infection n'entraîne que peu de décès, l'UB est à l'origine d'importantes incapacités

fonctionnelles [12]. Dans les pays d'endémie, le diagnostic est clinique. L'infection à *Mu* doit être suspectée devant tout nodule ou ulcère évolutif à bords décollés avec une hyperpigmentation périphérique [105]. Dans la plupart des cas, les professionnels de santé expérimentés des zones d'endémie, établissent un diagnostic clinique fiable. Il est, par contre, plus délicat sur les formes précoces, car d'autres pathologies présentent des symptômes similaires. Ainsi, selon l'âge du patient, le lieu où il vit, la localisation des lésions, la douleur et la zone géographique, il convient d'exclure du diagnostic d'autres affections, comme les ulcères phagédéniques tropicaux, les ulcères chroniques des membres inférieurs dus à une insuffisance artérielle ou veineuse (souvent dans les populations vieillissantes) [124]. Des travaux réalisés en Australie, révèlent qu'il arrive de confondre les lésions papuleuses initiales avec des piqûres d'insectes. L'inflammation du tissu cellulaire sous-cutané peut ressembler à un œdème dû à l'infection à *Mu*, mais dans ce cas, les lésions sont douloureuses et le patient est malade et fébrile [1]. L'affaiblissement du système immunitaire rend l'évolution clinique de l'ulcère de Buruli plus agressive et les résultats du traitement sont médiocres. De plus, en raison des voyages internationaux, des cas peuvent apparaître dans des zones où la maladie n'est pas endémique [1]. Il est donc important que les agents de santé connaissent l'ulcère de Buruli et son tableau clinique. L'OMS recommande la confirmation du diagnostic par des examens paracliniques [125]. La confirmation peut être obtenue en laboratoire à partir de différents échantillons selon les lésions :

- l'écouvillon : il est recommandé dans le cas de lésions ouvertes. Un minimum de 2 ou 3 prélèvements par écouvillonnage pour chaque lésion est recommandé. Les prélèvements doivent être réalisés sous les bords décollés et en profondeur de l'ulcère, lieu où les bacilles se trouvent en grande quantité (Photo 2 A).
- la biopsie : elle est pratiquée sur des lésions ouvertes ou fermées, principalement lors d'un acte chirurgical visant à retirer des tissus lésés [126].
- l'aspiration à l'aiguille fine : rapide, peu invasive et ne nécessitant pas de bloc opératoire, cette méthode est recommandée dans le cas de lésions fermées (Photo 2 B) [127, 128].

Quatre examens paracliniques sont proposés par l'OMS pour un diagnostic positif. Il faut au moins deux examens positifs pour affirmer le diagnostic.

- Examen direct au microscope en zone périphérique nécrotique ou coloration de Ziehl-Neelsen: la méthode met en évidence tous les bacilles du genre *Mycobacterium* (Figure 3 A). Elle n'est pas différentielle et reste peu sensible (40%). Mais elle a l'avantage d'être à la fois peu coûteuse

et facile à mettre en place, sa réalisation pouvant être confiée aux structures déjà existantes de lutte et de surveillance de la tuberculose ou de la lèpre.

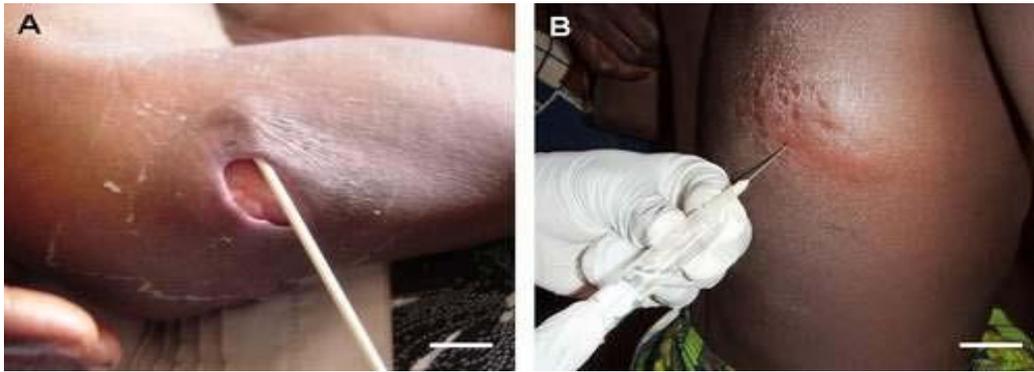
- Culture de *Mu* sur milieu de Loewenstein-Jensen ou de Coletsos : la culture est difficile, avec une croissance lente et une positivité faible avec une sensibilité de 20 à 60 %. *Mu* forme des colonies jaunes et rugueuses facilement reconnaissables sur milieu de Löwenstein-Jensen (Photo 3 C). Mais la durée d'incubation est très longue (plusieurs semaines à plusieurs mois) et les contaminations par d'autres microorganismes sont courantes. C'est donc une méthode peu utile pour le clinicien. Par contre, elle reste indispensable pour les recherches en épidémiologie moléculaire et pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques lors de rechutes éventuelles.

- Examen anatomo-pathologique qui requiert des biopsies, permet d'observer les traits caractéristiques des lésions dues à *Mu*, c'est-à-dire une nécrose des tissus contenant des BAAR extracellulaires et un infiltrat inflammatoire faible en périphérie de la nécrose (Photo 3). Sa sensibilité est de 90 % et la préparation des tissus exige un équipement important et coûteux et leur analyse demande une formation spécifique.

- Technique d'amplification d'ADN (PCR) : cette méthode d'amplification génique est très spécifique, plus rapide et plus sensible. Elle donne des résultats en deux jours et sa sensibilité est de 98 %. Le diagnostic de confirmation repose donc actuellement sur la PCR qui est la méthode courante du diagnostic. Mais elle est très peu utilisée en zone endémique en raison d'un matériel coûteux et non adapté au terrain. Actuellement, des méthodes de PCR alternatives sont en cours de développement sans toutefois donner entière satisfaction [129, 130]. Une nouvelle méthode de chromatographie en couche mince encore en investigation et qui met en évidence la mycolactone par fluorescence est une méthode de diagnostic rapide sur le lieu des soins. Cette méthode si elle est développée et commercialisée serait très utile sur le terrain.

En résumé, les méthodes de confirmation du diagnostic clinique ne sont pas assez sensibles : 40 à 80% pour la coloration de Ziehl-Neelsen, 20 à 60% pour la culture sur milieu de Loewenstein-Jensen, ou pas adaptées aux régions d'endémie [131]. La méthode la plus sensible (98%) et spécifique (100% en l'absence de contamination du matériel par des échantillons antérieurs), mais souvent difficile d'accès dans les zones d'endémie, est la PCR amplifiant la séquence d'insertion IS2404 [125, 131]. Il faut cependant remarquer que cette méthode ne permet pas un suivi du traitement, puisqu'elle reste positive par amplification de débris microbiens, bien après la guérison clinique. Face à cette situation, la recherche de

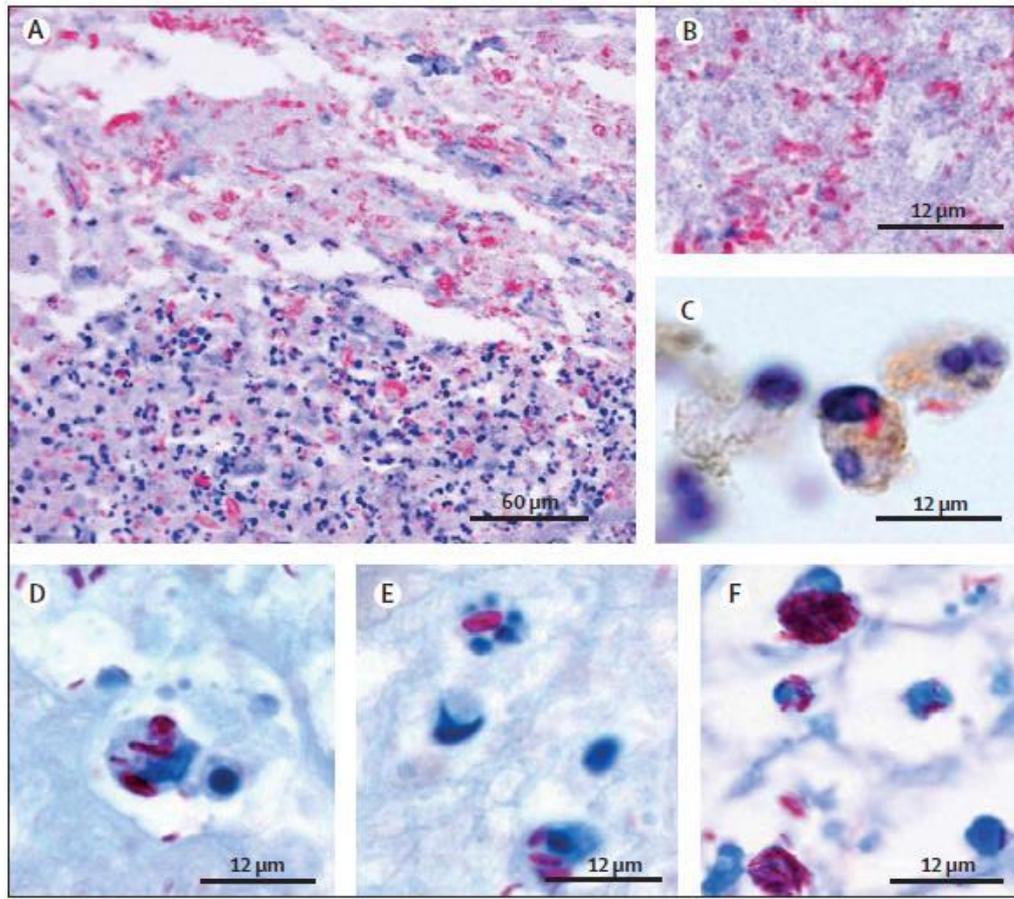
développement d'un nouvel outil diagnostique simple et réalisable dans les zones endémiques est nécessaire.



**Photo 2 :** Prélèvements pour le diagnostic de l'infection à *Mu*

(A) Prélèvement par écouvillonnage sur une forme ulcérée. Le prélèvement doit être réalisé en profondeur sous les bords décollés. Il est conseillé de réaliser plusieurs prélèvements à différents endroits ; (B) Prélèvement à l'aiguille fine. Cette méthode de prélèvement peu invasive et peu douloureuse est recommandée pour les lésions fermées. Echelle A et B : 2 cm.

**Source :** Dr A. Chauty, *Fondation Raoul Follereau, Pobé, Bénin.*



**Photo 3 :** Aspects anatomopathologiques de l'infection à *Mu*

Biopsie d'un patient africain (A). Les BAAR sont principalement trouvés dans la région supérieure nécrotique, tandis que la région inférieure montre un infiltrat inflammatoire. (B) Un détail de la région nécrotique montre des BAAR extracellulaires. (C) Bacille intramacrophagique de la région inflammatoire du panneau A. (D-E) Bacilles intracellulaires, provoquant l'apoptose (E, fragmentation du noyau) (F) Regroupement massif de bacilles intracellulaires.

*Source :* [132]

### 1.1.6 Aspects cliniques

#### 1.1.6.1 Les trois stades cliniques de l'ulcère de Buruli

Il y a une variation considérable des aspects cliniques et épidémiologiques à l'intérieur d'un pays ou d'un même contexte, mais aussi d'un pays ou d'un cadre à l'autre. Malgré que la maladie peut toucher n'importe quelle partie du corps, les lésions touchent fréquemment les membres : 35% les membres supérieurs, 55% les membres inférieurs et 10% d'autres parties

du corps. Comme son nom l'indique, l'UB se présente généralement sous la forme d'un ulcère, mais il peut également se manifester sous des formes non ulcérées ; les formes cliniques étant éminemment variables. Après une incubation de durée inconnue, de quelques semaines (nouveaux nés en Australie) à quelques mois voire plusieurs années [12, 36], l'UB évolue en 3 stades : le stade pré-ulcératif, le stade d'ulcération et le stade de cicatrisation et de séquelles. Au stade pré-ulcératif, la maladie peut se présenter sous quatre formes cliniques : le nodule, la papule, la plaque et l'œdème (Photo 4). Le nodule est la forme la plus fréquente. Il débute en zone sous-cutanée, il est dur, bien délimité, de 1 à 2 cm de diamètre, le plus souvent unique, indolore, froid, non adhérent au plan profond, accompagné d'une dépigmentation de la peau avoisinante [1, 12]. Son exérèse est indiquée et cicatrise au bout de quatre (4) semaines sans récurrence.

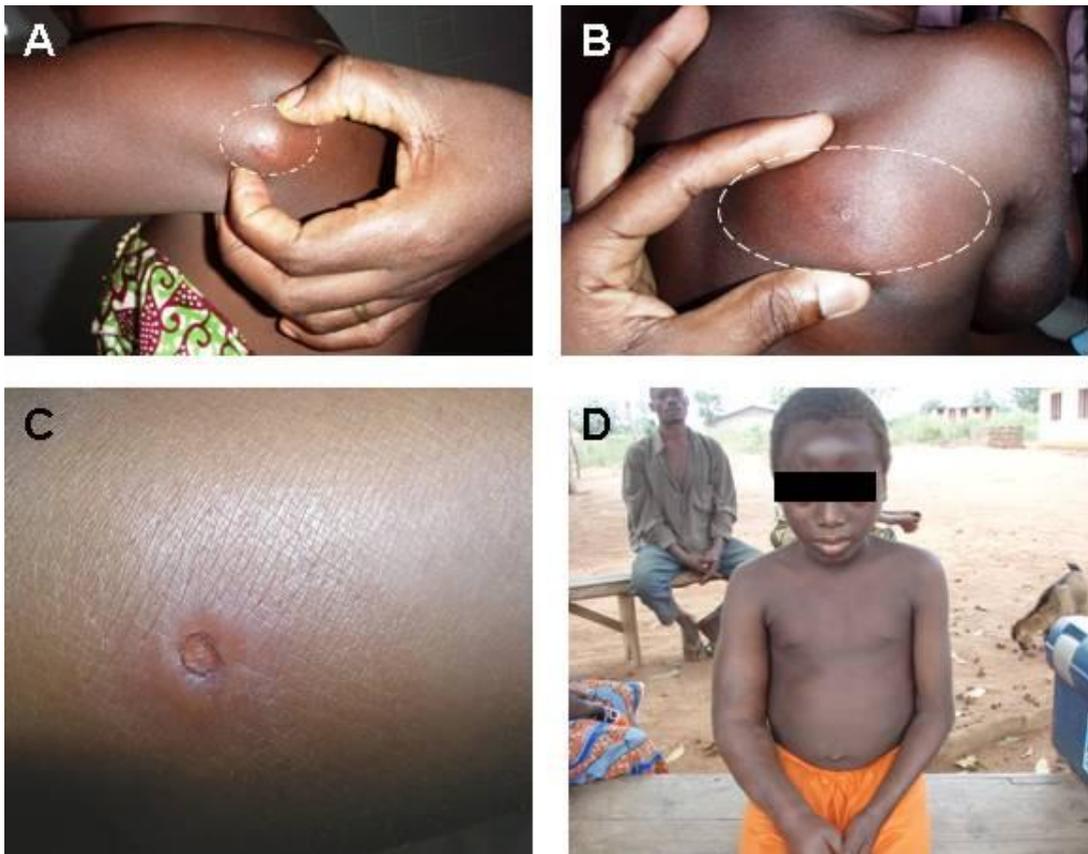
La papule commence par une lésion cutanée surélevée, indolore, de moins de 1 cm de diamètre, accompagnée d'une rougeur de la peau avoisinante. Cette forme est surtout observée en Australie. La plaque est d'aspect induré, elle est hyper pigmentée, surélevée, de plus de 2 cm de diamètre, aux bords irréguliers, indolores. La forme œdémateuse se manifeste par l'apparition brutale ou progressive d'un œdème qui a tendance à s'étendre à un membre entier englobant largement la zone où va débiter l'ulcération. Il peut être accompagné de signes inflammatoires locaux et de fièvre [1, 12].

Ces lésions évoluent insidieusement le plus souvent en ulcérations cutanées (Photo 5 A et B). Lorsque l'ulcération apparaît, celle-ci évolue très lentement et reste indolore, sans symptôme systémique. Elle apparaît à n'importe quelle partie de la lésion initiale et s'agrandit plus ou moins rapidement. C'est une perte de substance dermo-épidermique plus ou moins large, à fond nécrotique, jaunâtre, à bords décollés, avec un pourtour œdémateux et noirâtre. Son évolution est longue et émaillée de complications surtout infectieuses. Le décollement est dû à la nécrose du tissu adipeux sous cutané [1, 12, 36]. La surface de l'ulcération peut être restreinte alors que l'extension sous cutanée peut envahir tout un membre. Le fond de l'ulcère peut être gris jaunâtre, recouvert d'une gélatine adhérente ou granulomateuse. Ce fond, est à l'origine de l'appellation Tèfoun Tèfoun donnée par les Holis du Bénin à cette maladie en comparant la surface de la plaie qui ressemble à du coton [133]. Une lésion ulcérée peut dépasser les 15 cm et atteindre tout un membre ou une large partie du thorax.

Généralement, le caractère indolore des lésions, le poids sociologique des tradipraticiens, l'absence de fièvre, la longue distance des lieux de résidence aux hôpitaux et le coût des soins sont les causes d'une consultation tardive des patients [1]. Lorsque ces lésions ne sont pas

traitées, elles peuvent atteindre les muscles, les tendons et les os (Photo 5C). Malgré que les lésions peuvent s'étendre à toutes les autres parties du corps, l'ulcère de Buruli est rarement fatal. Toutefois, l'absence de traitements peut conduire à de sévères limitations des mouvements au niveau des articulations voire à des amputations (2 à 10% des cas) [1, 12, 14].

Après plusieurs mois et en l'absence de traitement, un processus de cicatrisation spontanée peut s'enclencher [1, 12]. Généralement, après la phase d'extension des lésions vers la périphérie, l'évolution peut se faire en plusieurs mois ou années vers la guérison spontanée, au prix d'une cicatrice fibreuse et rétractile gênant le jeu des articulations du voisinage. Souvent l'évolution est chronique, la ré-épithélialisation se faisant à un endroit alors que la nécrose se produit à un autre endroit [1, 12]. Sous traitement chirurgical, l'évolution est raccourcie et la guérison est obtenue au prix d'une cicatrice plus esthétique, mais les récurrences sont toujours possibles (Photos 5 E et F). Les conséquences socio-économiques de cette situation sont nombreuses puisque sont affectées la scolarité des enfants, l'activité professionnelle des adultes et l'intégration dans la communauté [30, 134-136]. Il existe également des formes mixtes avec des patients présentant des lésions d'UB à des stades différents ; des formes disséminées avec des manifestations cutanées multifocales et/ou extra cutanées. Ces formes sont de plus en plus décrites et caractérisées par des ulcérations simultanées ou consécutives multifocales isolées ou associées à des atteintes extra-cutanées ganglionnaires ou osseuses. La fréquence de ces formes disséminées d'UB avec atteintes ostéo-articulaires voire ganglionnaires est de plus en plus observées [35].



**Photo 4: Formes pré-ulcératives de l'ulcère de Buruli**

(A) Forme nodulaire, délimitée par les pointillés ; (B) Forme en plaque, délimitée par les pointillés ; (C) Forme papulaire ; (D) Forme œdémateuse qui touche tout un bras.

*Source : Dr A. Chauty, Fondation Raoul Follereau, Pobé, Bénin.*



**Photo 5 : Formes ulcératives et disséminées de l'ulcère de Buruli, séquelles et cicatrisation spontanée**

(A) Forme ulcératrice située au niveau du coude ; (B) Ulcération du coude ; (C) Formes disséminées avec atteintes osseuses et une lésion œdémateuse au niveau de l'œil ; (D) Surinfection à *S. aureus* sur une forme ulcérée ; (E) Cicatrices au niveau de la jambe après chirurgie ; (F) Séquelles générées après une guérison spontanée conduisant à des rétractions musculo-tendineuses.

**Source :** Dr A. Chauty, Fondation Raoul Follereau, Pobé, Bénin.

### **1.1.6.2 L'ostéite**

L'ostéite est une complication fréquente de l'UB. Lors d'une étude menée au Cameroun par l'ONG Médecins Sans Frontière (MSF), 50 cas d'ostéite sur 129 cas d'ulcère de Buruli (39 %) ont été dépistés [137]. Il est donc indispensable d'effectuer systématiquement des radiographies en regard des lésions afin d'adapter au mieux le traitement. On considère qu'il s'agit d'une reprise évolutive de la maladie, avec atteinte osseuse. Presque 41 % des ostéites sont situées en regard de l'ulcère, ce sont les ostéites de contact, contre 59% qui sont d'origine métastatique [27, 105]. D'autres atteintes que cutanées ou osseuses ont été observées, dont les atteintes nerveuses de mécanisme non précisé [27].

### **1.1.6.3 Les atteintes multifocales**

Dans certains cas, plusieurs lésions identiques ou différentes peuvent coexister chez le même malade avec cependant une conservation relative de l'état général dans un contexte non fébrile [105].

### **1.1.7 Traitement et réactions paradoxales**

Le traitement est promotionnel, préventif, curatif et réadaptatif

- Le traitement promotionnel vise à éviter le contact des personnes exposées avec les milieux contenant le germe en implémentant des systèmes de forage au bon endroit puis en promouvant son utilisation [2].
- Le traitement préventif : La vaccination au BCG (Bacille Calmette-Guérin) peut conférer une protection ou un retard dans le développement de la maladie mais la protection n'est que de six mois. La vaccination semble alors conférer une protection limitée.
- Le traitement curatif : La décision thérapeutique contre l'UB dépend de la catégorie à laquelle les lésions appartiennent. Les trois catégories qui contribuent à la décision thérapeutique sont :
  - Catégorie I : une lésion unique de moins de 5 cm de diamètre pouvant guérir complètement sous antibiothérapie,
  - Catégorie II : lésion unique de 5 à 15 cm de diamètre, pouvant guérir complètement sous antibiothérapie,
  - Catégorie III : lésion unique de plus de 15 cm de diamètre, lésions multiples, une ou plusieurs lésions sur des localisations critiques (œil, sein, organes génitaux) et une

ostéomyélite, nécessitant le recours à la chirurgie (excision, greffe cutanée ou amputation dans les cas graves).

Le traitement curatif de l'UB a connu des bouleversements ces dernières années suite à différents rapports démontrant l'efficacité d'une antibiothérapie parfois exclusive dans le traitement de la maladie. Jusqu'au début des années 2000, la chirurgie représentait le seul moyen de traitement selon le postulat que seule une exérèse large des lésions avec marges saines pouvait guérir le patient et prévenir les rechutes ou les disséminations [138]. En 1973, les résultats d'un premier essai thérapeutique sur 106 patients n'ont pas montré d'efficacité sur le nombre d'opérations chirurgicales requises ni sur la durée d'évolution d'un traitement par clofazimine en monothérapie [139]. Les résultats du cotrimoxazole, puis l'association rifampicine-dapsone n'ont pas non plus montré d'efficacité [140, 141]. Dans le même temps, in vitro, *Mu* était sensible à la rifampicine, aux aminosides, aux macrolides, et aux quinolones [89]. Toutefois, ce qui a relancé la question de l'antibiothérapie chez l'homme, étaient les résultats de nombreuses publications ayant suggéré l'efficacité d'une antibiothérapie chez la souris.

Un premier essai en 2005 a montré que l'administration chez l'homme de rifampicine (10 mg/kg/j) et streptomycine (15 mg/kg/j) pendant quatre semaines avant l'exérèse d'une plaque ou d'un nodule non ulcéré inhibait toute culture bactérienne sur le tissu d'exérèse, rejetant ainsi le postulat selon lequel l'étendue de la nécrose rendait *Mu* inaccessible aux antibiotiques [142]. Au Bénin, en 2007, plus de 200 patients présentant une lésion évocatrice ont reçu exclusivement ce traitement antibiotique pendant quatre semaines [143]. Après quatre semaines, l'état clinique de tous les patients s'était amélioré, de telle façon que pour 40% (n = 91) d'entre eux qu'aucune chirurgie n'a été jugée nécessaire, alors que treize (13) patients avaient initialement présenté des ulcères de plus de 15 cm. L'antibiothérapie exclusive a été poursuivie quatre semaines supplémentaires chez 122 patients. Au total, près de 80% des ulcères de moins de 5 cm ont été traités par antibiothérapie seule, contre 20 % des ulcères de plus de 15 cm. Un an après la fin du traitement, trois rechutes seulement étaient comptabilisées (dont deux chez des patients ayant reçu une antibiothérapie exclusive), soit une proportion inférieure aux taux de rechutes rapportés ultérieurement dans le cadre d'une prise en charge par chirurgie exclusive [139, 142]. Mais deux problèmes majeurs se posaient à cause de l'injection intramusculaire quotidienne de streptomycine à savoir l'asepsie du site d'injection en zone rurale tropicale reculée, et la toxicité cochléo-vestibulaire. Plusieurs études ont ainsi cherché à réduire ou remplacer l'usage de la

streptomycine dans le traitement de l'UB. Un essai thérapeutique fût alors réalisé au Ghana et au Bénin pour évaluer formellement l'efficacité du traitement oral par clarithromycine et rifampicine contre l'UB. Deux études pilotes, réalisées au Ghana, puis au Bénin ont finalement montré l'efficacité d'une association rifampicine/streptomycine ou rifampicine/clarithromycine pour traiter cette maladie [142-144] et ces associations sont devenues les traitements de références associés ou non à la chirurgie. Les recommandations officielles de l'OMS pour la prise en charge de l'UB dépendent partiellement de la présentation clinique. Depuis 2004, l'OMS préconise un traitement antibiotique pendant 4 à 8 semaines sur toutes les formes de la maladie combinant la rifampicine et la streptomycine [145]. Cependant, une durée prolongée de traitement à la streptomycine peut entraîner une perte auditive et la néphrotoxicité chez les patients atteints de l'UB [146]. En 2017, le groupe technique consultatif de l'OMS sur l'UB a recommandé le traitement par voie orale de la combinaison entre la clarithromycine et la rifampicine. Aujourd'hui, diverses associations d'antibiotiques administrées pendant huit semaines sont utilisées pour traiter l'UB quel qu'en soit le stade. Selon le patient, on peut prescrire l'une des associations suivantes : une association de rifampicine (10 mg/kg une fois par jour) et streptomycine (15 mg/kg une fois par jour) ou une association de rifampicine (10 mg/kg une fois par jour) et clarithromycine (7,5 mg/kg deux fois par jour). Un essai contrôlé randomisé s'est achevé en 2017. Les premiers résultats ne montrent aucune différence pour les taux de guérison entre les deux traitements. Pour les femmes enceintes, on considère que l'association de rifampicine et de clarithromycine est l'option la plus sûre à cause des contre-indications de la streptomycine. En prélude à la mise en œuvre de la nouvelle feuille de route de l'OMS pour les maladies tropicales négligées 2021-2030, l'OMS a recommandé en août 2020, avec l'introduction de la clarithromycine à la place de la streptomycine [34]. En Australie, une association de rifampicine (10 mg/kg une fois par jour) et de moxifloxacine (400 mg une fois par jour) est aussi utilisée avec de bons résultats bien que son efficacité n'ait pas été prouvée par un essai randomisé [25]. Au niveau national, cette combinaison d'antibiotiques a déjà été introduite dans plusieurs pays africains endémiques de l'UB. La livraison gratuite des antibiotiques est assurée aux centres de dépistage et de traitements à travers les programmes nationaux de lutte contre l'ulcère de Buruli. Toutefois, la logistique impliquée dans l'approvisionnement en médicaments des centres de santé ruraux éloignés est compliquée et l'accès aux antibiotiques nécessaires n'est pas toujours sécurisé. D'autres coûts supplémentaires de traitement directs et indirects tels que le transport et le séjour dans les établissements de santé, la gestion des plaies et la perte du travail des patients et des garde-

malades doivent être couverts par les patients et leurs familles. Les revenus directs des ménages constituent la principale source de financement de ces coûts, principalement par le biais de paiements directs, ce qui peut avoir des conséquences catastrophiques pour les économies des ménages [120, 122]. L'avènement récent de traitements oraux ambulatoires exclusifs pour les formes modérées de lésions pourrait modifier notablement le délai de consultation des patients et limiter le fardeau que représente pour eux la prise en charge et les séquelles de l'UB avec tout de même un risque plus élevé d'abandon de traitement ou de perdu de vue. La situation est encore aggravée par le fait que de nombreux patients viennent à l'hôpital à un stade très avancé de la maladie, pour lequel le traitement est à la fois beaucoup plus exigeant et plus coûteux. Dans ces conditions, bien que le traitement antibiotique soit efficace, une destruction importante des tissus complique la guérison et conduit souvent à des contractures et des déformations. Pour ces types de lésions graves, un débridement chirurgical, une greffe de peau et une rééducation physique peuvent être nécessaires après une antibiothérapie. Ces limitations fonctionnelles tout au long de la vie sont le résultat de grandes lésions et sont associées à la perte de main-d'œuvre, l'abandon scolaire [135], la stigmatisation et l'exclusion sociale [147]. L'antibiothérapie est peu efficace sur les lésions osseuses. Sous traitement antibiotique, une aggravation transitoire des lésions peut être observée laissant supposer une rechute. Elle ne doit pas être interprétée comme un échec au traitement, mais comme une réaction paradoxale, vraisemblablement induite par la diminution de l'action immunosuppressive de la mycolactone sous l'effet des antibiotiques [105, 148, 149]. Cependant, les nouvelles lésions n'ont pas les caractéristiques d'un UB : elles sont douloureuses, présentent des signes d'inflammation et ne contiennent pas de bacilles viables (cultures négatives). Pour remédier à ce phénomène, un soin local de la plaie est nécessaire. Mais en absence de recommandation et de consensus, le traitement effectué est très variable : curetage, drainage, corticothérapie. Cette réaction paradoxale est parfois comparée au phénomène des réactions réverses de type 1, rencontrées dans la lèpre.

Certaines interventions, comme la prise en charge des plaies et la chirurgie (principalement le débridement et la greffe cutanée), sont utilisées pour accélérer la guérison et ainsi réduire la durée de l'hospitalisation. De plus, la physiothérapie est nécessaire dans les cas graves pour éviter les incapacités [25]. En ce qui concerne les soins des plaies, les pansements quotidiens après lavage à l'eau propre et le nettoyage au savon doux (savon à base d'huile de palme), puis des pansements humides de détersion en période d'ulcération tiennent une place significative pour les lésions de moins de 10 cm. Les pansements « modernes » adaptés aux plaies chroniques ont prouvé leur efficacité dans l'accélération de la guérison lorsqu'ils sont combinés avec le

traitement antibiotique, la kinésithérapie et l'ergothérapie. Toutefois, le problème de ces pansements modernes est leur coût [105].

Ceux qui gardent des incapacités doivent suivre une réadaptation de longue durée. La fréquence des séquelles fonctionnelles nécessite une kinésithérapie et une ergothérapie précoces actives et passives. Ces mêmes interventions s'appliquent à d'autres maladies tropicales négligées, comme la lèpre ou la filariose lymphatique, et il est donc important d'intégrer une approche sur le long terme dans le système de santé pour que tous les patients en bénéficient. L'approche intégrée pour la lutte contre les maladies non transmissibles cutanées donne l'occasion d'intégrer la détection et la prise en charge de l'ulcère de Buruli avec ces maladies [105].

Pour limiter les rétractions cutanées, source de séquelles invalidantes, la chirurgie réparatrice et reconstructive initiale est utilisée. Elle fait appel aux techniques d'exérèse - greffe. La chirurgie des séquelles et des rechutes est fondamentale et limite les cicatrices dystrophiques et les rétractions (greffes de peau totale, lambeaux). Les rechutes après chirurgie surviennent de façon précoce, en moyenne 5 mois après l'intervention et se présentent sous forme d'ulcérations, pour la plupart localisées au niveau de la lésion initiale. Les rechutes signalées dans 16 à 30 % des cas après un traitement exclusivement chirurgical ont été ramenées à moins de 2 % après l'introduction des antibiotiques. Le traitement de l'UB associant une bi-antibiothérapie à tous les stades de la maladie pendant 8 semaines entraîne la guérison des lésions précoces, une stabilisation de la maladie ou une régression des lésions permettant une exérèse chirurgicale moins délabrante.

## **1.2 Problématique**

### **1.2.1 Enoncé du problème**

Les problèmes posés par l'ulcère de Buruli sont multiples et plusieurs questions touchant à l'écologie de *Mu* et son mode de transmission subsistent encore.

- **L'écologie de *Mu* est assez complexe et son mode de transmission n'est pas encore élucidé**

L'UB est une maladie infectieuse causée par *Mu* qui sévit dans les régions intertropicales humides. Dans les années 1980, l'augmentation du nombre de cas en Afrique de l'Ouest était telle que l'ulcère de Buruli était considéré comme une maladie émergente [133, 150]. Le traitement est fait actuellement de huit semaines d'antibiothérapie, de soins des plaies, de chirurgie et de prévention des incapacités par la rééducation fonctionnelle [151, 152]. Les techniques standards au laboratoire pour confirmer l'ulcère de Buruli sont l'amplification

génique (PCR), la culture, l'histopathologie, la recherche des bacilles acido-alcoolorésistants (BAAR) au microscope [153]. En 1997, l'OMS a mis en place l'Initiative Mondiale de lutte contre l'UB (IMUB). Depuis lors, beaucoup de recherches ont été menées, et d'autres sont en cours, afin de mieux comprendre le mode de transmission de la maladie, développer des outils de diagnostic, puis mettre à la disposition des pays endémiques des moyens de traitement adéquats.

Les études épidémiologiques ont fourni les preuves que le principal réservoir du bacille *Mu* est l'environnement aquatique. Cependant, l'échec de l'isolement du bacille dans l'environnement limite la compréhension de son écologie et de son mode de transmission. En effet, l'isolement de *Mu* dans des prélèvements environnementaux était rendu difficile par la lenteur de développement du bacille et par une température de croissance de 30°C favorable au développement de nombreux autres microorganismes. Il n'y avait pas de milieu sélectif, ni de méthode de concentration du bacille, ni même de connaissances sur ses exigences métaboliques favorables à sa croissance. C'est par le développement de la PCR que *Mu* a été détecté dans l'environnement aquatique, à la fin des années 90. L'élaboration des modèles expérimentaux en laboratoire a également participé à une meilleure compréhension des relations entre le bacille et certains acteurs de la chaîne trophique aquatique [3, 77]. Plusieurs études épidémiologiques montrent que les bouleversements environnementaux (déforestations, création de Zones humides) favorisent l'expansion de la maladie [143, 154, 155]. Elles montrent également qu'il n'y a pas de transmission inter humaine et l'homme se contaminerait au contact de l'environnement aquatique [58, 144, 156] où il y aurait inoculation du bacille dans le tissu cutané [132]. Les résultats de toutes les études réalisées jusqu'à ce jour (rôle des punaises aquatiques, moustiques, mollusques, plantes aquatiques, etc.) n'aboutissent pas à un consensus quant au mode de transmission exact de *Mu*. Cette méconnaissance retarde la mise en place de mesures préventives, voire protectrices.

### **Quels sont les zones précises et le mode de contamination de l'UB ? Quelles stratégies de prévention primaire peut-on implémenter ?**

- **Les modifications anthropiques et environnementales qui pourraient influencer l'incidence de l'infection ne sont pas bien documentées**

Les premières descriptions de patients atteints de l'ulcère de Buruli à travers le monde sont liées à une perturbation de l'environnement aquatique. Plusieurs articles suggèrent que l'augmentation de l'incidence serait liée aux inondations. En ce qui concerne cette maladie, la majorité des études épidémiologiques sont systématiquement rétrospectives (cas/témoins) et le

nombre de patients, dont le diagnostic est certain (diagnostic moléculaire) est faible. L'accès à une large cohorte de patients associé à des données de qualité et exhaustives reste délicat et complexe, limitant les explorations épidémiologiques fines. A titre d'exemple, ces explorations ont montré dès les années 1970 que la fréquentation des zones humides était le facteur de risque le plus important. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés régulièrement lors de micro-études épidémiologiques [12] en Nouvelle Guinée [157], au Nigéria, au Libéria et au Cameroun [12]. Les résultats de ces différents travaux confirment que les bouleversements environnementaux associés à des changements du mode de vie des populations contribuent à l'émergence ou à la réémergence de l'UB. Ces bouleversements favorisent un environnement adéquat au développement de *Mu*, permettent l'augmentation d'hôtes et de vecteurs de *Mu* s'ils existent. Ils augmentent enfin la densité humaine autour d'un environnement contaminé, facilitant le contact de l'homme et de *Mu*. L'ensemble de ces observations montre que *Mu* est une mycobactérie environnementale issue d'un réservoir hydro-tellurique.

Les études réalisées ont permis d'identifier des éléments clés dans l'épidémiologie de l'infection à *Mu*. Toutefois, ces études ne permettent pas de mettre en exergue les évolutions anthropiques et environnementales pouvant influencer l'incidence de l'infection. **Quelles sont alors les modifications anthropiques et environnementales qui influencent l'incidence de l'UB ?**

- **Evolution différentielle de l'incidence de l'ulcère de Buruli dans les départements de l'Ouémé et du Plateau couverts par le même CDTLUB**

En Afrique, le Bénin a été l'un des pays impliqués dans la lutte contre l'ulcère de Buruli. Ainsi, avec l'aide d'ONGs, des centres spécialisés dans le diagnostic et le traitement de l'ulcère de Buruli ont été construits dès le début des années 2000 tel que le Centre de Diagnostic et de Traitement de la Lèpre et de l'Ulcer de Buruli de Pobè (CDTLUB-Pobè). Ce centre couvre deux départements du Bénin, le Plateau et l'Ouémé. Ils se différencient principalement par des cours d'eau qui n'appartiennent pas au même versant, des modes d'exploitation et d'occupation des sols différents, des origines ethniques différentes, et la présence d'un fleuve dans l'Ouémé (fleuve Ouémé).

Après une importante augmentation de 2003 à 2006, le nombre de nouveaux cas diminue considérablement dans l'Ouémé les années suivantes. A titre d'exemple, 228 cas ont été diagnostiqués en 2003 contre 75 en 2014, soit une diminution de 67%. Dans le Plateau, le nombre de cas (effectif plus petit que dans l'Ouémé) en 2016 est sensiblement le même qu'en 2005 même s'il existe des fluctuations durant cette période. Dans ces deux zones, on observe

une évolution différenciée de l'incidence de la maladie alors qu'elles bénéficient d'un accès aux soins comparable et la lutte contre l'ulcère de Buruli (en termes de campagne d'information, de dépistage actif de traitement et de suivi) qui est assurée par la même équipe médicale du CDTLUB de Pobè [158]. Cette observation suggérerait l'intervention d'un ou de facteur(s) environnemental (aux) ou anthropiques sur l'incidence de la maladie, tout particulièrement dans la zone de l'Ouémé. Dans ce contexte, l'antibiothérapie ou l'accès au soin de façon plus générale ne pourraient être la cause unique de la diminution du nombre de cas dans l'Ouémé. Les résultats de plusieurs études de terrain (études écologiques, suivi de cohorte, suivi des patients, dépistage actif) réalisées dans la même zone [3, 67, 68, 127, 159-161] révèlent l'augmentation continue du nombre de forage facilitant l'accès à de l'eau protégée tout particulièrement dans les zones endémiques de l'Ouémé.

Il est donc nécessaire de vérifier les autres facteurs potentiels qui pourraient expliquer cette variation afin de proposer des mesures préventives efficaces. **Quels facteurs pourraient expliquer cette diminution de l'incidence de l'ulcère de Buruli ? Y a-t-il des habitudes de vie, des rapports à l'eau qui sont à risques ? Sont-ils les mêmes dans le Plateau et l'Ouémé ? Ces variations peuvent-elles expliquer l'évolution de l'incidence de la maladie ?**

- **Relation entre la fréquentation des zones endémiques, activités humaines et taux de contamination environnementale par *Mu***

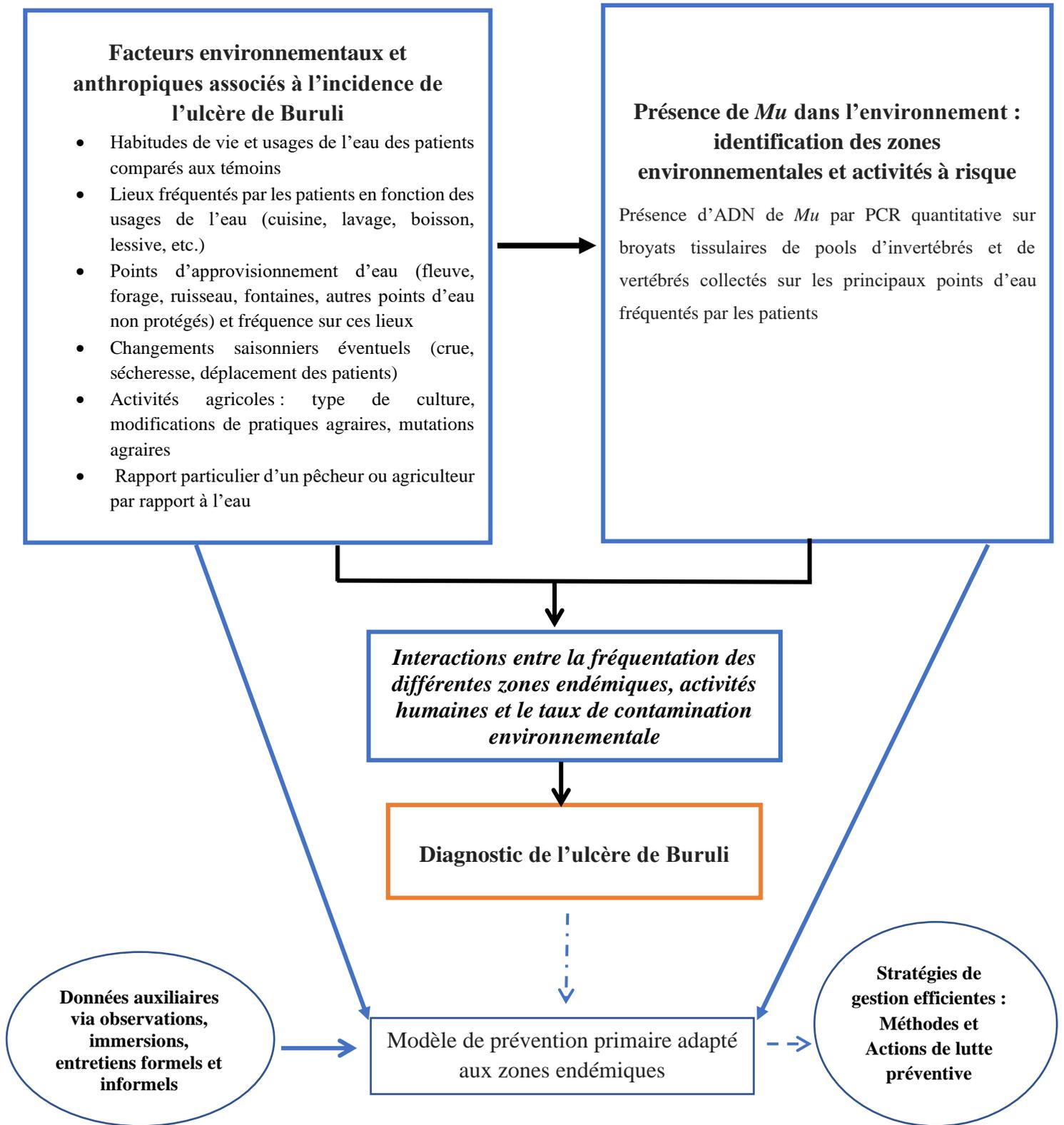
Les principales études sur le réservoir de *Mu* convergent vers la conclusion que l'environnement aquatique est le principal réservoir de *Mu*. De plus, de nombreuses études environnementales, dont certaines réalisées au Bénin dans le département de l'Ouémé, ont démontré la présence d'ADN de *Mu* dans des vertébrés et invertébrés aquatiques [3, 63, 64, 72, 74, 76, 77, 90, 126, 160, 162, 163] et particulièrement chez les punaises aquatiques. Au Cameroun, des travaux réalisés ont montré qu'il y avait des variations saisonnières au niveau du taux de colonisation des insectes aquatiques par *Mu* [162] pouvant expliquer une saisonnalité dans l'apparition des cas humains [96]. Une étude réalisée au Bénin dans plusieurs départements, dont celui de l'Ouémé, a montré qu'il existe un lien entre la présence de *Mu* (taux de détection de *Mu*) dans l'environnement aquatique et l'incidence de l'infection à *Mu*. Cependant, ces études n'ont pas analysé en profondeur les relations entre la fréquentation des différentes zones, activités humaines, et taux de « contamination environnementale ». **Quels liens existent entre la fréquentation des zones endémiques, les activités humaines et le taux de contamination environnementale par *Mu* ?**

En résumé, malgré les efforts de recherche consentis contre cette maladie tropicale négligée dans les zones endémiques, plusieurs questionnements subsistent jusqu'à ce jour. Les différentes études menées dans le cadre de ce travail de thèse vont permettre de répondre aux questions suivantes soulevées dans l'énoncé du problème :

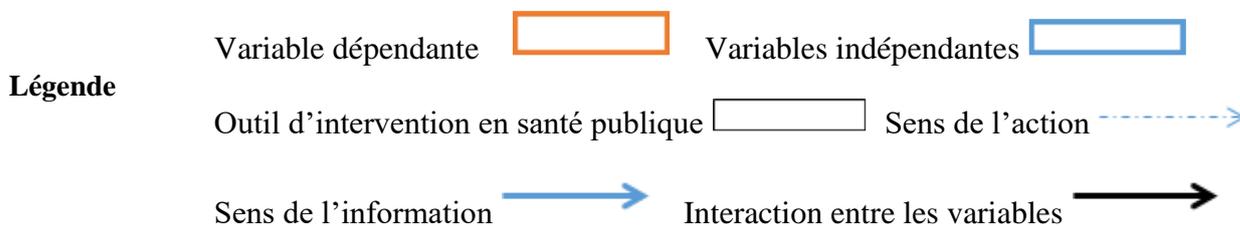
- Quels sont les facteurs anthropiques et environnementaux favorisant une diminution de l'incidence de l'ulcère de Buruli ?
  - Quels liens existent entre la fréquentation des zones endémiques, les activités humaines et le taux de contamination environnementale par *Mu* ?
- Quelles stratégies préventives adaptées aux zones endémiques et aux modes de vie des populations touchées pourrait-on développer et implémenter ?

**Notre thèse de doctorat s'inscrit dans une tentative de réponses à ces différents questionnements à l'aide d'une approche multidisciplinaire présentée dans le cadre conceptuel suivant.**

## 1.2.2 Cadre conceptuel



**Figure 6 : Schéma de l'approche conceptuelle des facteurs environnementaux et anthropiques associés à la variation de l'ulcère de Buruli dans les départements de l'Ouémé - Plateau au Sud du Bénin**



## **Présentation de l'approche conceptuelle**

Aujourd'hui, les mesures adéquates de prévention primaire sont inexistantes en raison d'une méconnaissance exacte des modes de transmission de *Mu*. La mise en place de mesures préventives est un élément clé pour contrôler cette maladie infectieuse. Le développement de ces mesures adaptées requiert la mise en œuvre d'une approche globale intégrant une meilleure connaissance des facteurs comportementaux et environnementaux.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, une méthodologie multidisciplinaire regroupant des compétences médicale, épidémiologique, microbiologique et en géographie de santé est utilisée. Grâce à cette approche conceptuelle, l'analyse des interactions entre la fréquence des différentes zones endémiques, les activités humaines et le taux de contamination environnementale est réalisée. En complément de cette analyse, des données auxiliaires à travers les observations, immersions, entretiens formels et informels avec les leaders d'opinion sont collectées. Les résultats de tous ces travaux nous ont permis de proposer un modèle de prévention primaire adapté aux zones endémiques avec des stratégies de gestion efficiente.

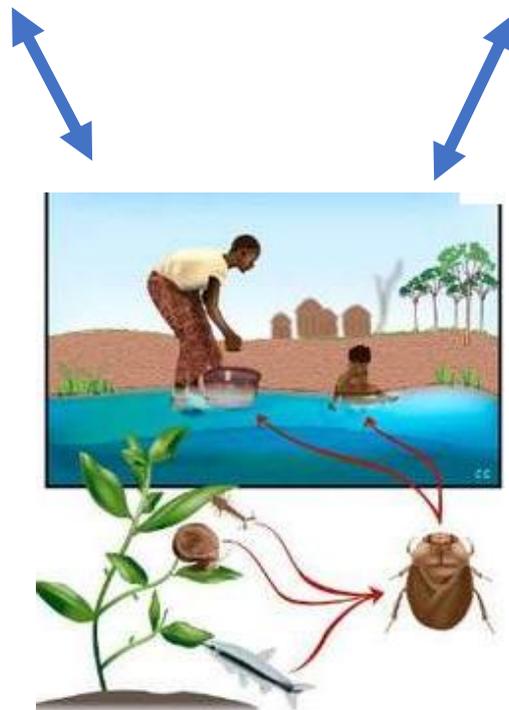
L'ensemble des approches dans le cadre de cette thèse, incluant les études épidémiologiques, environnementales et microbiologiques a été conçu avec des perspectives d'applications en termes de prévention. Les travaux de recherche sont focalisés sur l'interaction de trois facteurs à savoir l'environnement, le mode de vie des patients d'UB et l'écologie de *Mu* comme présentés sur la figure 7 ci-dessous.



**Environnement de vie des patients**



**Mode de vie des patients**



**Ecologie de *Mycobacterium ulcerans***

**Figure 7 : Schéma de recherche représentant l'interaction de l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mu***

### 1.2.3 Hypothèses

L'analyse du cadre conceptuel a permis d'aboutir à trois hypothèses :

**Hypothèse 1 :** L'incidence de l'ulcère de Buruli est liée aux habitudes de vie et usages des populations par rapport à l'eau.

**Hypothèse 2 :** La répartition spatiale de *Mycobacterium ulcerans* est associée aux zones environnementales à risque de contamination.

**Hypothèse 3 :** L'incidence de l'ulcère de Buruli est due à l'interaction entre la fréquentation des zones endémiques, les activités humaines et le taux de contamination environnementale par *Mycobacterium ulcerans*.

### 1.2.4 Objectifs

**Objectif général :** Etudier les facteurs associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dans les départements de l'Ouémé-Plateau au Sud du Bénin

#### **Objectifs spécifiques et approche méthodologique**

**Objectif spécifique 1 :** Déterminer les facteurs comportementaux à risque pour l'infection à *Mycobacterium ulcerans*. Nous allons identifier par la réalisation d'études épidémiologiques cas-témoins prospective, les habitudes de vie et usages de l'eau les plus à risque.

**Objectif spécifique 2 :** Mesurer le taux de contamination environnementale par *Mycobacterium ulcerans*. Nous allons démontrer la présence de *Mycobacterium ulcerans* dans les environnements où l'homme pratique ses activités quotidiennes par la réalisation d'études environnementales afin d'identifier les environnements où l'homme peut se contaminer lors de ses activités.

**Objectif spécifique 3 :** Analyser les interactions entre l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mycobacterium ulcerans*. Nous allons analyser la relation entre l'incidence de l'ulcère de Buruli, la fréquentation des zones endémiques, les activités humaines et le taux de contamination environnementale par *Mycobacterium ulcerans* grâce à la triangulation des résultats d'études épidémiologique, environnementale et de la géographie de la santé.

La revue de littérature que nous avons réalisé afin de recenser les travaux réalisés jusqu'à ce jour dans la lutte contre cette maladie tropicale négligée dans les zones endémiques, nous a permis de publier un article de synthèse sous forme de chapitre de livre **en libre accès dans la revue Springer.com en Août 2019 à Genève en Suisse.**

## **Chapitre 2. Buruli ulcer in Africa : Benin and Cameroon Cases**

**Authors :** Earnest Njih Tabah, Christian R. Johnson, **Horace Degnonvi**, Gerd Pluschke, and Katharina Röltgen

**Affiliations:**

E. N. Tabah, National Yaws, Leishmaniasis, Leprosy and Buruli Ulcer Control Programme, Ministry of Public Health, Yaounde, Cameroon

C. R. Johnson, Fondation Raoul Follereau, Paris, France & University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin

**H. Degnonvi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin**

G. Pluschke · K. Röltgen, Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland  
University of Basel, Basel, Switzerland

E-mail: [gerd.pluschke@swisstph.ch](mailto:gerd.pluschke@swisstph.ch)

L'objectif de ce livre, qui est le résultat d'une revue de littérature, est de résumer l'état actuel de la recherche sur l'ulcère de Buruli. Il récapitule les notions sur la compréhension de l'épidémiologie et la lutte contre la maladie en Afrique en l'occurrence au Bénin et au Cameroun puis fournit les perspectives sur les activités actuelles et futures de recherche.

Les chapitres de livres couvrent l'histoire, le diagnostic épidémiologique, le traitement et la charge de morbidité de l'ulcère de Buruli et fournissent un aperçu de la microbiologie, la génomique, la transmission et de la virulence de *Mycobacterium ulcerans*.

**Il a été publié en libre accès dans la revue Springer.com en Août 2019 à Genève en Suisse.**

## RESUME

L'ulcère de Buruli ou infection à *Mycobacterium ulcerans* est une maladie émergente tropicale négligée selon les critères de l'OMS. Elle est devenue la troisième mycobactériose dans le monde après la tuberculose et la lèpre. Cette infection, qui touche principalement les enfants de moins de quinze ans, provoque des ulcérations cutanées massives accompagnées de séquelles très invalidantes et stigmatisantes.

Dans la plupart des régions endémiques, l'ulcère de Buruli est une maladie des pauvres qui, si elle n'est pas traitée, peut conduire à des incapacités permanentes avec des déficiences psychosociales et socioéconomiques très graves.

Plus de 20 ans après le lancement par l'OMS de l'Initiative mondiale contre l'ulcère de Buruli en 1998, des progrès considérables ont été réalisés vers la compréhension du mode de transmission et le contrôle de cette maladie tropicale négligée de la peau, autrefois mystérieuse.

Les principales réalisations ont été l'évaluation et l'introduction réussie d'une thérapie antibiotique composée de rifampicine orale et de clarithromycine administrée quotidiennement pour 8 semaines, la mise au point d'un test diagnostique basé sur la Polymerase Chain Reaction (PCR) pour détecter l'ADN de l'agent causal, *Mycobacterium ulcerans* dans les spécimens de lésion, et l'établissement des programmes nationaux de lutte contre l'ulcère de Buruli dans l'Ouest et le Centre de l'Afrique dans les pays les plus endémiques.

Ces dernières années, le nombre de nouveaux cas d'ulcère de Buruli signalés à l'OMS a diminué dans la plupart des pays endémiques en l'occurrence en Afrique en dehors de l'Australie où le nombre de cas ne cesse d'augmenter malgré la qualité du système de santé comparée à celle des pays en voie de développement.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette situation même si aucune ne fait l'unanimité à elle seule dans la communauté scientifique. Toutefois, l'hypothèse la plus plausible serait la limite de contact avec les points d'eau non protégés due à l'augmentation et l'utilisation des points d'eau de forage par les populations vulnérables et à risque de contracter la maladie.

Les connaissances limitées sur les réservoirs et les vecteurs de l'agent pathogène et les modes de transmission constituent une source imprévisible de nouvelles infections.

## 1 Introduction

The first description of skin lesions resembling those caused by *Mycobacterium ulcerans*, dates back to the late nineteenth century, when the missionary physician Albert Cook [1] recorded a range of chronic, necrotizing skin ulcers in patients in Uganda. In the 1950s and 1960s a larger case series of patients with similar ulcers was detected in today's Nakasongola district in Uganda [2, 3], formerly known as Buruli County. Since then, cases of the disease, henceforth designated "Buruli ulcer" (BU), were reported from 20 additional African countries, where the major burden commonly falls on children aged five to 15 years. BU in Africa is characterized by a patchy geographical distribution, affecting mainly rural communities with often very high local prevalence rates. Access to the formal health sector in these regions is limited and as a result knowledge on the actual distribution and frequency of infections is scanty [4]. The occurrence of *M. ulcerans* infections in Africa is closely linked to areas of land drained by rivers and their tributaries. While the probability of person-to-person transmission is thought to be very low, the nature of relevant environmental reservoirs is highly controversial and the mode by which the pathogen is transmitted from

---

E. N. Tabah (✉)

National Yaws, Leishmaniasis, Leprosy and Buruli Ulcer Control Programme, Ministry of Public Health, Yaounde, Cameroon

C. R. Johnson

Fondation Raoul Follereau, Paris, France

University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin

H. Degnonvi

University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin

G. Pluschke · K. Röltgen

Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland

University of Basel, Basel, Switzerland

e-mail: [gerd.pluschke@swisstph.ch](mailto:gerd.pluschke@swisstph.ch)

© The Author(s) 2019

G. Pluschke, K. Röltgen (eds.), *Buruli Ulcer*,

[https://doi.org/10.1007/978-3-030-11114-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11114-4_2)

43

environmental sources to humans is not clarified [5, 6]. Several routes for the introduction of *M. ulcerans* into the susceptible layers of the skin are discussed.

Causes of BU disease are commonly perceived by the local population as somewhat mysterious and are often associated with witchcraft or sorcery [7–9]. Also insect bites, contamination of skin lesions, and contact with swamps and water bodies often connected with changes in ecology are considered risk factors for contracting BU and a concept of dual causality is frequently encountered, particularly among affected populations in West African countries [9]. As a consequence, patients may first consult traditional healers or prayer camps to deal with witchcraft before seeking biomedical treatment at hospitals or health centers. Other patients may consider care seeking at the formal health sector only as a last resort [8, 10, 11]. Findings from a biosocial analysis of BU among fishermen in northwestern Uganda revealed that late presentation for biomedical treatment resulted from a perceived lack of its efficacy and a perceived efficacy of herbalists' treatment, which was sought promptly after first signs of lesions appeared [12]. These insights explain why in many BU endemic regions a high proportion of patients present to formal health facilities with large lesions, which require extended periods for healing and often result in permanent disabilities. According to the WHO classification system, BU lesions fall into one of three categories. Category I includes single, small lesions (nodules or ulcers) below five cm in diameter, Category II comprises single lesions between five and 15 cm in diameter as well as plaque and edematous forms, and Category III includes single lesions above 15 cm in diameter, multiple lesions, lesions at critical sites such as eyes, genitalia, and joints, as well as osteomyelitis [13]. Category II and III lesions are particularly prevalent in remote areas, where access to healthcare is limited and awareness of the disease is low. Surveillance and reporting of cases supported by community health workers, teachers, and other community volunteers are important elements for the control of BU. As long as preventable risks are not clearly identified and no vaccine is available, the main goal is to diagnose and treat patients in an early disease stage, when most lesions heal fast and without adjunct surgical treatment so that long-term sequelae and other complications can be avoided.

A momentum for the establishment of organized National BU Control Programs (NBUCPs) in the most affected countries was created by the Yamoussoukro Declaration and the global BU Initiative, launched by WHO in 1998 [14]. The three main pillars of global and national BU control strategies included (1) the strengthening of health systems by the development of infrastructure and provision of training for health workers, (2) sensitization and involvement of communities by information and education campaigns to facilitate early case detection and reporting, and (3) standardized case management in terms of diagnosis, treatment, and prevention of disability.

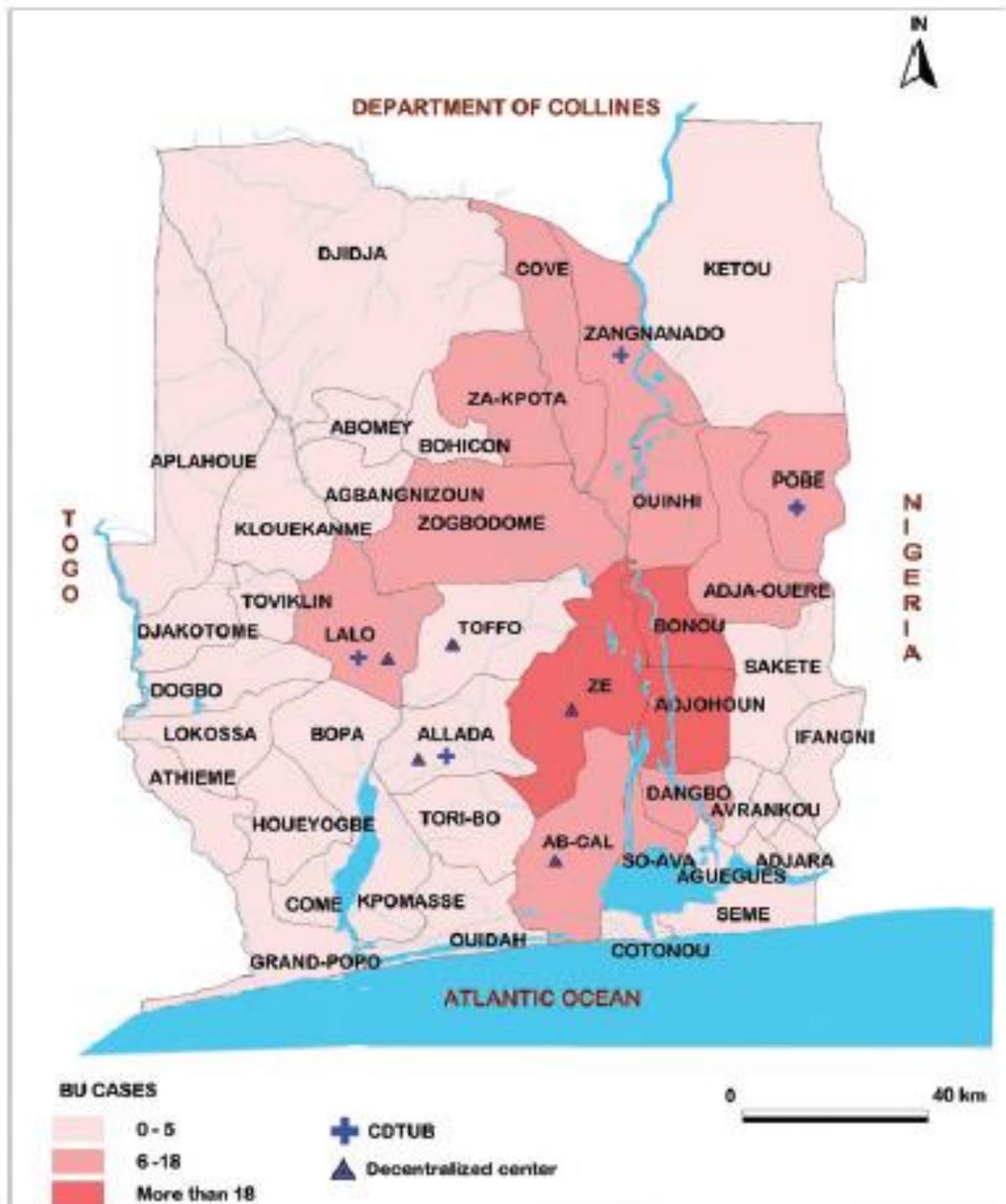
BU has been reported from five of the six WHO regions except the European region [4]. However, Africa bears the brunt of the disease burden with around 57,500 cases reported to WHO from 16 African countries between 2002 and 2016, representing 98% of all BU cases recorded worldwide during that time. The decreasing numbers of cases reported to WHO in the past couple of years play their part in further neglect of BU. Major efforts are required in the coming years to mobilize resources for the establishment, maintenance, and expansion of BU control activities.

**Box 1: Benin**

The first case of BU in Benin was registered in 1977 at the Saint Camille Hospital in Dogbo (Couffo Department). A first focus of the disease was detected in the Ouinhi district (Zou Department) in 1988 [19], cases of which were reported by Muelder and Nourou in 1990 [20]. The NBUCP in Benin was created in 1997 and surveillance using the WHO BU01 and BU02 forms started in 2003. In Benin, there are four peripheral BU-DTCs, which are locally referred to as ‘Centre de Dépistage et de Traitement de l’Ulcère de Buruli (CDTUB)’. These centers, which are responsible for the implementation of BU control activities, are distributed across the main endemic regions and located in Allada, Lalo, Pobe, and Zangnanado (Fig. 1). Health workers at these facilities have considerable experience in diagnosing and treating BU patients. Early case detection and referral of patients to the CDTUBs is supervised by health workers of the nearest health post, but relies strongly on community-based surveillance teams, comprising village volunteers (‘relais communautaires’) and teachers (‘focal points’). These teams are also responsible for the follow-up of patients after treatment. In order to facilitate reporting at each CDTUB, BU cases are registered on a BU02 form, which is sent out each quarter to regional authorities and the NBUCP, where data are analyzed and mapped. Feedback is provided annually by the NBUCP at a review meeting attended by the heads of all CDTUBs and other partners involved in BU activities in Benin. The CDTUBs perform quarterly data analyses, which they feed back to the teams in each center. Refresher workshops for the teams are conducted and new team members are trained [17]. This system allows to (1) conduct permanent active surveys for BU, (2) determine the burden of the disease, (3) provide the most adapted care for each patient. With this system in place, the number of reported BU cases increased steadily from 2003, reached a peak of 1203 cases in 2007 and decreased continuously thereafter, to 312 in 2016. The geographical distribution of BU cases in 2016 is shown in Fig. 1.

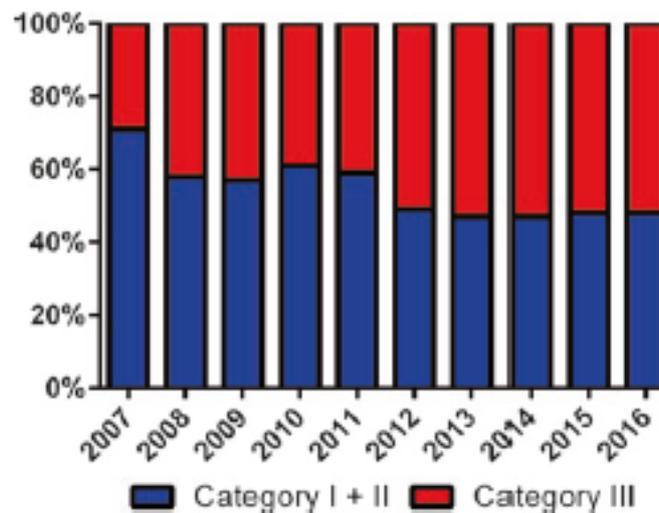
In contrast to the decrease in the number of new BU cases reported in recent years in Benin, the percentage of patients diagnosed with WHO Category III lesions has increased (Fig. 2). Between 2007 and 2011 the number of new BU cases with Category I and II lesions detected was much higher than those with Category III lesions, whereas almost half of the newly detected BU cases between 2012 and 2016 were diagnosed with Category III lesions.

Therefore, the current challenge for the Ministry of Health through the NBUCP is to effectively address the issue of severe, chronic BU lesions. According to national health statistics, 267 new BU cases were detected in 2017. Of these, 46% presented with ulcers, 30% with mixed forms, 13% with plaques, and only a minority with nodules and edema. For a significant proportion of cases (23%) in 2017 BU-related disability was registered at entry.



**Fig. 1** Geographical distribution of BU in Southern Benin. The map illustrates the number of reported BU cases in 2016 as well as the location of the CDTUBs in the main BU endemic region of Benin

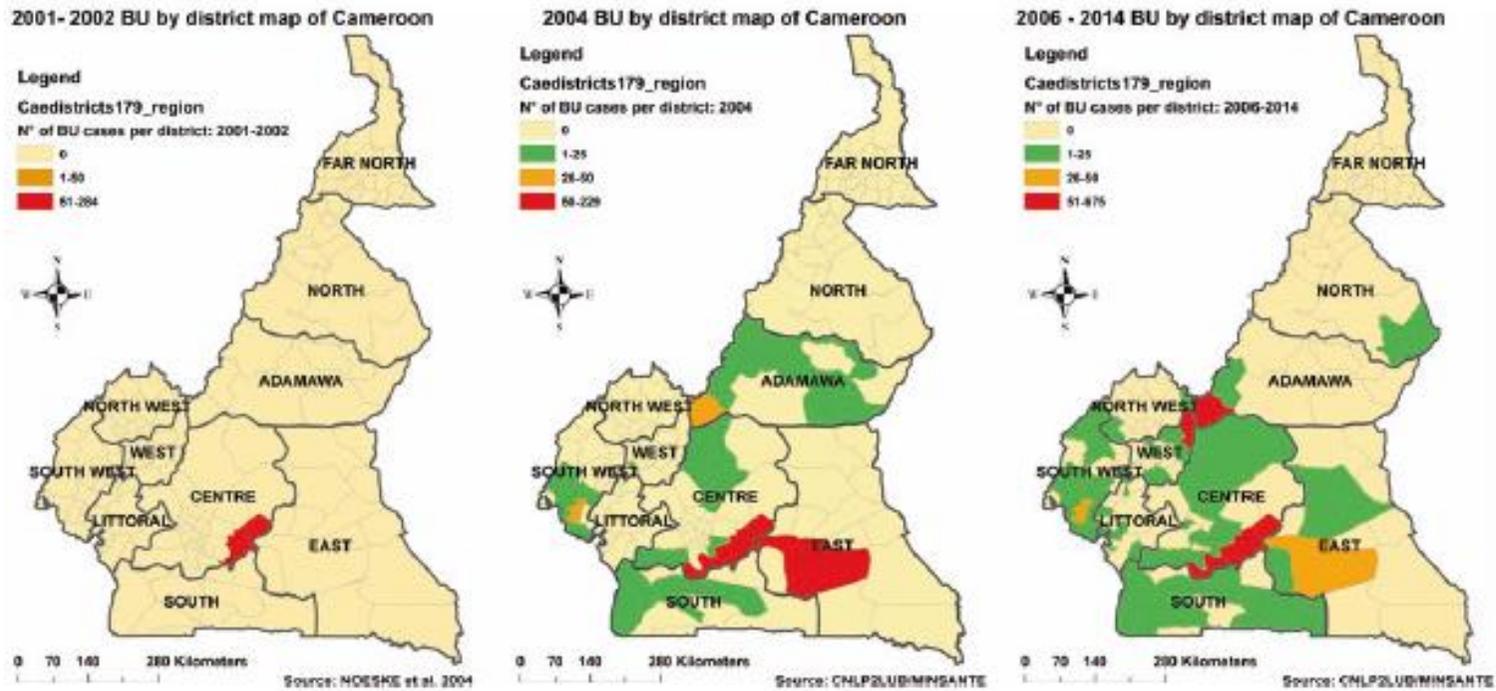
**Fig. 2** Evolution of new BU cases detected in Benin according to the WHO classification system. The percentage of patients diagnosed with Category III (red) and Category I and II (blue) lesions is shown



### Box 2 Cameroon

BU was first reported in Cameroon in 1969 [21]. Organized BU control in the country began 33 years later with the creation of two BU-DTCs in Ayos and Akonolinga in 2002 with the support of FAIRMED (formerly known as ALES (Aide Aux Lépreux Emmats-Suisse)) and MSF (Médecins Sans Frontières) Suisse, respectively. Effectiveness of BU management in these initial centers prompted the Ministry of Health in Cameroon to establish an NBUCP in 2004. Following a national BU survey in 2004, three additional BU-DTCs were created in 2006 in the three newly identified highly endemic health districts, namely Bankim, Mbonge, and Ngoantet-Mbalmayo. The initial strategy of medical teams from these BU-DTCs was to perform mass screening for BU, sensitization and awareness campaigns in communities and schools, and management of the BU cases detected. Gradually, health committees were activated in the intervention areas, and became responsible for community sensitization and awareness campaigns for BU, case-finding, and referral. Community participation in referral of suspected cases to the BU-DTCs for confirmation and treatment increased after many volunteers were trained to recognize BU in their communities. As communities became more aware of BU, active case-finding gradually gave way to passive case-finding with cases coming on their own or being referred to BU-DTCs.

In Cameroon, the WHO BU02 forms together with activity reports are sent by BU-DTCs to the NBUCP on a monthly basis. Between 2002 and 2016, 3850 BU cases were reported in the country, with a peak of 914 cases seen in 2004, explained by the national survey for BU in that year. Considerably lower numbers of cases were reported in recent years with a trough of 85 cases in 2016. Between 2002 and 2014 the number of health districts identified to be endemic for BU rose from 2 to 64 (Fig. 3). While endemic regions were mainly detected in the South and Central part of Cameroon, a national survey is required to confirm the suspected presence of BU in the northern part of the country. However, it has been shown that a reduction in program resources and activities by the major support partners over the past years has led to decreased surveillance activities, which has negatively impacted performance indicators in Cameroon [18].



**Fig. 3** Increase in the number of health districts identified to be BU endemic between 2001 and 2014 [18]

In many African BU endemic areas, government expenditure on health care is extremely low. Low per capita income and limited potential for domestic revenue mobilization hamper the ability of governments to respond effectively to national health problems, such as BU. Many NBUCPs depend strongly on external partner funding, which has decreased considerably in the past few years in some of the BU endemic countries, leading to a decrease in BU surveillance and laboratory confirmation of cases. This may in turn lead to a rise in the proportion of patients reporting with WHO Category III lesions [18]. Therefore, financing remains a key challenge for the establishment and sustainability of effective BU control programs.

## 2.2 Diagnosis and Treatment of BU

In addition to relatively typical ulcerative disease stages, BU may present in the form of rather unspecific, non-ulcerative nodules, edema, or plaque lesions. The clinical diagnosis of BU in Africa is complicated by many skin conditions with similar presentation ranging from cysts, lipoma, psoriasis, skin lymphomas, tropical ulcers, ulcerated skin malignancies, and venous or vascular ulcers, over bacterial skin infections such as actinomycosis, boils, cellulitis, ecthyma, folliculitis, furuncle, impetigo, noma, treponematosi s, parasitic infections including cutaneous leishmaniasis and myiasis, to cutaneous tuberculosis, leprosy, and atypical mycobacteriosis [17, 22, 23]. At the level of district health facilities, microscopic detection of acid-fast bacilli (AFBs) is usually the only available laboratory diagnostic test for BU. As this method has limited sensitivity and specificity, specimens from suspected lesions are commonly collected and shipped in bulk to diagnostic reference laboratories for the detection of *M. ulcerans* DNA by PCR analysis, the current gold standard for the diagnosis of BU. To avoid further delay and dropout of patients, treatment of clinically suspected BU cases is often started before PCR results are reported back to the health centers.

Since 2004, WHO recommends treatment of BU with an 8-week course of daily combination antibiotic therapy consisting of oral rifampicin and injectable streptomycin [13]. However, prolonged duration of streptomycin therapy can cause persistent hearing loss and nephrotoxicity in BU patients [24]. In 2017 the WHO Technical Advisory Group on BU decided that the recommendation for treatment should be changed to oral clarithromycin and rifampicin, pending the full results of a clinical trial for the new regimen. At national level, this combination has already been introduced in several African BU endemic countries. Free provision of antibiotics to BU treatment centers is managed by the NBUCPs. However, logistics involved in the supply of the drugs to remote, rural health facilities is complicated and access to the required antibiotics is not always secured. Other direct and indirect treatment costs, such as for transport and stay at health facilities, wound management, and loss of labor of patients and caretakers have to be covered by patients and their families. The main source of funding for these costs is direct household spending, mostly through out-of-pocket payments, which may prevent patients from seeking care or

may have catastrophic consequences for the household economies [25, 26]. The situation is further aggravated by the fact that many patients report with advanced stages of the disease, for which treatment is both much more demanding and more expensive. Although antibiotic treatment is effective, extensive destruction of tissue complicates healing and often leads to contractures and deformities. For such lesions, surgical debridement, skin grafting, and physical re-education may be required after antibiotic therapy. Lifelong functional limitations are a common outcome of large ulcers and are associated with loss of workforce, school abandonment [27], stigma, and social exclusion [28].

Early detection of BU, the development of an inexpensive, sensitive and specific point-of-care diagnostic test suitable for pre-treatment diagnosis, as well as the development of shorter treatment regimens suitable for decentralized care in rural endemic areas are key priorities for future efforts to improve the control of BU in Africa. For the diagnosis at field sites, the application of *M. ulcerans* antigen capture-based approaches are currently being evaluated [29]. Local thermotherapy of BU lesions using heat packs filled with phase change material [30] may be developed into an alternative treatment option if antibiotic treatment is not indicated, not tolerated or not readily available. Considering the continued preference of many patients to first seek care from traditional healers, sustained collaborations between community health workers, BU-DTC health staff, and traditional healers is essential for the implementation of BU control activities [10].

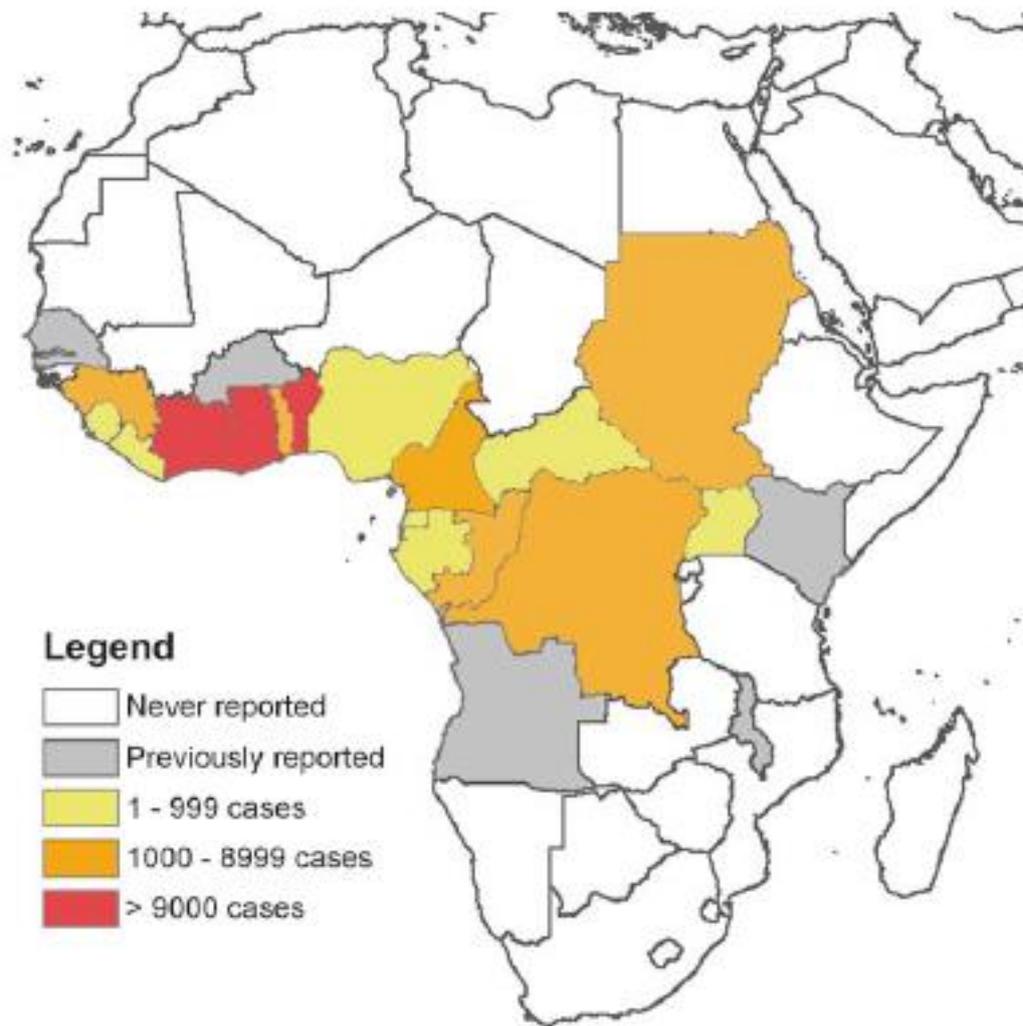
---

### 3 Geographical Distribution of BU: Reporting of Cases Versus Actual Situation in Africa

The geographical distribution of BU cases in Africa by country reported to WHO between 2002 and 2016 is illustrated in Fig. 4, with Côte d'Ivoire, Ghana, and Benin being the most affected.

These three countries were among the first with well-established BU surveillance systems [31–34], after their governments have signed the Yamoussoukro declaration on BU in 1998, an agreement to mobilize resources for the establishment of NBUCPs with technical support from WHO. In Cameroon, which is ranked fourth among the most affected countries, a wide-spread distribution of endemic regions was detected upon increased case-finding activities (Fig. 3) [18], strongly suggesting that the number of BU cases is vastly underestimated in some other BU endemic countries, where organized BU control programs have only more recently been set in place. This is for example illustrated by large series of BU patients from Nigeria, who presented to established health facilities in Benin over the past few years [35, 36], demonstrating an urgent need for the improvement of BU control activities in Nigeria [37].

Reasons for a marked reduction of new infections reported from Africa in the past few years are not entirely understood, but may at least in part be related to a decline in international support for BU control programs [18]. In Ghana, the annual BU case confirmation rates gradually decreased over the past years, from a high



**Fig. 4** Geographical distribution of BU in Africa by country. The map shows an accumulated number of cases reported to WHO between 2002 and 2016. Data source: WHO

proportion of 76% in 2009 to a trough of only 15% in 2016. High confirmation rates in earlier years may be attributed to prior training activities on case detection and proper specimen collection provided by the NBUCP to healthcare givers within the facilities of the Ghana Health Service as well as to quarterly early case search activities conducted within the framework of the Stop BU project by researchers of the Noguchi Memorial Institute for Medical Research. The downward trend in confirmation rates may be a reflection of both an actual reduction in BU incidence and ceasing outreach activities by the NBUCP in recent years [38]. On the other hand, initiation of surveillance activities in the endemic countries may have led to the detection of many patients with long-standing infections and the current number of reported cases may reflect more the true incidence of BU. As the shedding of the bacteria from chronic BU lesions is hypothesized to fuel potential reservoirs of the pathogen, early identification and treatment of BU patients may lead to a reduction

of the bacterial burden in the environment, which may in turn reduce transmission. This view is supported by the fact that no major animal reservoir has been detected to date in Africa, as opposed to BU endemic areas of southern Australia, where large numbers of possums in BU endemic settings were shown to be infected with *M. ulcerans* [39]. Another aspect to be considered is the potential cyclical occurrence of the disease associated with environmental or climatic factors. Also, a number of African countries, where BU cases had been detected in the past, do no longer report cases to WHO. These include countries where political instability or overburdened health systems may prevent efforts to control BU. On the other hand, also the possibility of over-reporting in areas where access to reliable laboratory confirmation is limited has to be taken into consideration, when estimating the actual burden of BU in Africa.

#### 4 Distribution of BU Among Affected Populations In Africa

The distribution of BU within endemic countries is highly focal and local prevalence rates may vary from one village to another. Affected populations commonly live in remote, rural areas, which are sometimes largely isolated from the world around. Families typically live on subsistence-level agriculture and small-scale husbandry and obtain their water from nearby rivers or tributaries. Stagnant water bodies, which are used for washing clothes or bathing, appear to be strongly associated with the occurrence of BU [40] (Fig. 5).

In many areas the emergence of BU or an increase in the incidence of BU have been ascribed to environmental disturbances such as damming of rivers, establishment of permanent wet agricultural areas like rice fields, deforestation, sand digging or mining activities with remaining water holes and seasonal ponds. For example, on the campus of the University of Ibadan, Nigeria, damming of a small stream flowing through the campus was associated with the emergence of BU among



**Fig. 5** Typical BU endemic settings in Africa. Left photograph: Health post in Cameroon. Right photograph: Water site in Cameroon used for doing the laundry or bathing

Caucasians living on site [41]. In northern Liberia, BU cases emerged when the Manor River was dammed and wetlands extended for swamp rice farming [42]. Other examples include the damming of the Mapé River in Cameroon [43], the Densu River in Ghana [44], and the Bandama River in Côte d'Ivoire [45]. Apart from man-made environmental changes, heavy rainfall may also lead to an upsurge of BU; in Uganda, an outbreak in the Busoga District was for example related to unprecedented flooding of the lakes of Uganda between 1962 and 1964 [46].

All age groups may be affected with an often equal gender distribution. However, children between five and 15 years of age are vastly overrepresented among cases in Africa, even if the age distribution of the typically very young general population is taken into account [47, 48]. In contrast, very young children seem to be underrepresented [47], and sero-epidemiological studies of populations living in BU endemic areas of Ghana and Cameroon have shown that children below the age of four years are also less exposed to *M. ulcerans* than older individuals [49, 50]. This suggests that exposure to *M. ulcerans* intensifies at an age, when children start to have more intense contact with the environment, outside their hitherto confined movement range. While the risk of developing BU seems to drop in young adults, the population age adjusted cumulative incidence of BU in the elderly was reported to be similar to that in older children [47, 48]. This may be related to immunosenescence, the gradual deterioration of the immune system associated with natural age advancement. The fact that in Japan and Australia middle-aged or elderly individuals are most commonly affected may at least in part reflect the much higher average age of the population living in the BU endemic areas.

Mounting evidence exists that infection with HIV increases the risk of BU [51]. Moreover, a number of case studies report a more aggressive progression of BU in HIV-positive individuals [52–54]. Although helminth infections elicit an immune response potentially enhancing susceptibility to mycobacterial diseases, no association between BU and schistosomiasis was found in one study [55]. Potential associations of BU with other co-infections prevalent in African BU endemic areas or with malnutrition have not been systematically investigated so far. Studies on a potential link between susceptibility to BU and host genetic factors are in their infancy [56, 57] and are hampered by the limited number of BU cases that can be enrolled in the studies.

---

## 5 The Etiology of BU In Africa

*M. ulcerans* is an acid-fast mycobacterium that has evolved from an *M. marinum*-like progenitor through an evolutionary bottleneck event; the acquisition of a virulence plasmid, encoding the enzymatic machinery for the synthesis of the unique macrolide toxin mycolactone [58]. Subsequent genome reduction and pseudogene development is indicative of an adaptation of *M. ulcerans* to a more stable ecological niche [58]. Definite identification of an environmental niche is complicated by the extraordinarily long generation time of *M. ulcerans*. This hampers the isolation of the bacterium from potential environmental sources, as *M. ulcerans* is readily

overgrown by other, less fastidious organisms, including other environmental mycobacteria that are also resistant to decontamination methods developed for primary isolation [59, 60]. Considering that the occurrence of BU is commonly associated with stagnant water bodies in river basins, a habitat in aquatic ecosystems seems likely. Indeed, *M. ulcerans*-specific DNA sequences were detected by PCR analyses in environmental samples, such as biofilms, water, soil and plants, as well as in various aquatic animals [5]. For unclear reasons, vastly different PCR positivity rates have been reported in various studies conducted in BU endemic regions of Africa [40, 61, 62]. In contrast to endemic sites in Australia, where terrestrial mammals may be implicated as reservoirs in the disease ecology of *M. ulcerans* [39, 63], no similar reservoir has so far been detected in Africa [6, 64]. Therefore, it has been hypothesized that shedding bacilli from large chronic lesions of BU patients into the environment may play a role in *M. ulcerans* transmission in African BU endemic areas [4]. While mosquitoes have been proposed as vectors of *M. ulcerans* in Australia, several modes of transmission including vector-mediated, but also skin trauma-induced may be involved in African settings [5]. Direct person-to-person transmission is considered unlikely.

All *M. ulcerans* isolates derived from lesions of BU patients from Africa have been found to belong to the classical *M. ulcerans* lineage. Genetic diversity of these isolates is very low and only comparative whole genome sequencing allowed resolving the population structure and evolutionary history of African *M. ulcerans* disease isolates. These genome analyses have identified in many BU endemic areas, local clonal complexes of *M. ulcerans* that show limited diversification by the accumulation of point mutations and are associated with particular hydrological drainage areas [44, 65–67]. After introduction of *M. ulcerans* in a particular area, the local clone seems to remain isolated, which allows some point mutations to become fixed in that population. Spread of these locally confined clonal complexes between endemic areas seems to occur only rarely [68, 69], speaking against the existence of a highly mobile animal reservoir. While the dominating African *M. ulcerans* sublineage MU\_A1 has been endemic in Africa for several hundred years, another less common and geographically more restricted African sublineage (MU\_A2) has been recently identified, which seems to have been introduced into the African continent in the late nineteenth and early twentieth century [66]. Sequence analyses of the virulence plasmid pMUM encoding genes for the biosynthesis of mycolactones have shown that all mycolactone producing mycobacteria have evolved from the same progenitor which has acquired the plasmid [70]. Different *M. ulcerans* lineages produce different species of mycolactone; the *M. ulcerans* disease isolates from Africa mainly produce mycolactone A/B, the most potent form of the toxin [71, 72]. There is no doubt that the ability to produce mycolactone is critical for the evolution and persistence of *M. ulcerans* as a human pathogen. While the combination of cytotoxic and immunosuppressive properties of mycolactone is thought to confer a fitness advantage for *M. ulcerans* in mammalian hosts by preventing an immune system-mediated elimination of the bacteria, it is not yet clear how the bacteria might benefit from mycolactone production in aquatic niche environments.

## 6 Future Perspectives

If human BU lesions prove to be a relevant maintenance reservoir for *M. ulcerans* transmission, active case-finding programs, improved disease surveillance, early diagnosis, and adequate treatment may lead to a reduction in disease transmission. This hypothesis is supported by the recent decline in the number of new infections reported to WHO from many African countries and particularly from areas, where effective BU control programs have been implemented. A major challenge for the coming years will be the maintenance of established control strategies and the implementation of improved diagnostic tools and treatment approaches.

In many regions of Africa a number of tropical skin diseases, such as cutaneous leishmaniasis, leprosy, lymphatic filariasis, mycetoma, onchocerciasis, and yaws are co-endemic with BU. Screening of individuals for the presence of skin conditions in communities or schools offers the opportunity to detect these neglected diseases using a common rather than a disease-specific approach. Development of locally adapted triage criteria and diagnostic algorithms for the recognition of changes in the appearance of the skin can furthermore allow health workers at the primary health care level making appropriate decisions on either treatment or referral of patients. After specific treatment, repair of tissue damage often requires similar wound management approaches. Therefore, integrated strategies for the control and management of these diseases are now strongly promoted by the WHO Department of control of neglected tropical diseases (WHO/NTD) [73].

## References

1. Billington WR (1970) Albert Cook 1870-1951: Uganda pioneer. *Br Med J* 4(5737):738-740
2. Clancey JK, Dodge OG, Lunn HF, Oduori ML (1961) Mycobacterial skin ulcers in Uganda. *Lancet* 2(7209):951-954
3. Clancey JK (1964) Mycobacterial skin ulcers in Uganda: description of a new Mycobacterium (*Mycobacterium Buruli*). *J Pathol Bacteriol* 88:175-187
4. Röltgen K, Pluschke G (2015) Epidemiology and disease burden of Buruli ulcer: a review. *Res Rep Trop Med* 2015(6):59-73
5. Merritt RW, Walker ED, Small PL, Wallace JR, Johnson PD, Benbow ME et al (2010) Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 4(12):e911
6. Röltgen K, Pluschke G (2015) Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer): potential reservoirs and vectors. *Curr Clin Microbiol Rep* 2(1):35-43
7. Mulder AA, Boerma RP, Barogui Y, Zinsou C, Johnson RC, Gbovi J et al (2008) Healthcare seeking behaviour for Buruli ulcer in Benin: a model to capture therapy choice of patients and healthy community members. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(9):912-920
8. Aujoulat I, Johnson C, Zinsou C, Guedenon A, Portaels F (2003) Psychosocial aspects of health seeking behaviours of patients with Buruli ulcer in southern Benin. *Trop Med Int Health* 8(8):750-759
9. Peeters Grietens K, Toomer E, Um Boock A, Hausmann-Muela S, Peeters H, Kanobana K et al (2012) What role do traditional beliefs play in treatment seeking and delay for Buruli ulcer disease?—insights from a mixed methods study in Cameroon. *PLoS One* 7(5):e36954
10. Awah PK, Boock AU, Mou F, Koin JT, Anye EM, Noumen D et al (2018) Developing a Buruli ulcer community of practice in Bankim, Cameroon: a model for Buruli ulcer outreach in Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 12(3):e0006238

11. Renzaho AM, Woods PV, Ackumey MM, Harvey SK, Kotin J (2007) Community-based study on knowledge, attitude and practice on the mode of transmission, prevention and treatment of the Buruli ulcer in Ga West District. *Ghana Trop Med Int Health* 12(3):445–458
12. Pearson G (2018) Understanding perceptions on ‘Buruli’ in northwestern Uganda: a biosocial investigation. *PLoS Negl Trop Dis* 12(7):e0006689
13. WHO (2012) Treatment of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): guidance for health workers. World Health Organization, Geneva
14. WHO (2000) Buruli ulcer: *mycobacterium ulcerans* infection. World Health Organization, Geneva
15. Hayriye Işik HN (2013) Health care system and health financing structure, the case of Cameroon. *Int Anatol Acad Online J Health Sci* 1(2):24–44
16. Bertrand NAS (2012) Analysis of determinants of public hospitals efficiency in Cameroon. *Int J Econ Commer Res* 2(2):31–65
17. Junghans T, Johnson RC, Pluschke G (2014) *Mycobacterium ulcerans* disease. In: Farrar J, Hotez PJ, Junghans T, Kang G, Lalloo D, White NJ (eds) *Manson’s tropical diseases*, 23rd edn. Saunders, Edinburgh, pp 519–531
18. Tabah EN, Nsagha DS, Bissek AC, Njamnshi AK, Bratschi MW, Pluschke G et al (2016) Buruli ulcer in Cameroon: the development and impact of the national control programme. *PLoS Negl Trop Dis* 10(1):e0004224
19. Muelder K (1988) Buruli ulcer in Benin. *Trop Dr* 18(2):53
20. Muelder K, Nourou A (1990) Buruli ulcer in Benin. *Lancet* 336(8723):1109–1111
21. Ravisse P (1977) Skin ulcer caused by *Mycobacterium ulcerans* in Cameroon. I. Clinical, epidemiological and histological study. *Bull Soc Pathol Exot Fil* 70(2):109–124
22. Bratschi MW, Njih Tabah E, Bolz M, Stuecki D, Borrell S, Gagneux S et al (2012) A case of cutaneous tuberculosis in a Buruli ulcer-endemic area. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8):e1751
23. Toutous Trelu L, Nkemenang P, Comte E, Ehounou G, Atangana P, Mboua DJ et al (2016) Differential diagnosis of skin ulcers in a *Mycobacterium ulcerans* endemic area: data from a prospective study in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis* 10(4):e0004385
24. Klis S, Stienstra Y, Phillips RO, Abass KM, Tuah W, van der Werf TS (2014) Long term streptomycin toxicity in the treatment of Buruli ulcer: follow-up of participants in the BURULICO drug trial. *PLoS Negl Trop Dis* 8(3):e2739
25. Chukwu JN, Meka AO, Nwafor CC, Oshi DC, Madichie NO, Ekeke N et al (2017) Financial burden of health care for Buruli ulcer patients in Nigeria: the patients’ perspective. *Int Health* 9(1):36–43
26. Grietens KP, Boock AU, Peeters H, Hausmann-Muela S, Toomer E, Ribera JM (2008) “It is me who endures but my family that suffers”: social isolation as a consequence of the household cost burden of Buruli ulcer free of charge hospital treatment. *PLoS Negl Trop Dis* 2(10):e321
27. Stienstra Y, van Roest MH, van Wezel MJ, Wiersma IC, Hospers IC, Dijkstra PU et al (2005) Factors associated with functional limitations and subsequent employment or schooling in Buruli ulcer patients. *Tropical Med Int Health* 10(12):1251–1257
28. Owusu AaA C (2012) The socioeconomic burden of Buruli ulcer disease in the GA West District of Ghana. *Ghana J Dev Stud* 9(1):5–20
29. Dreyer A, Roltgen K, Dangy JP, Ruf MT, Scherr N, Bolz M et al (2015) Identification of the *Mycobacterium ulcerans* protein MUL\_3720 as a promising target for the development of a diagnostic test for Buruli ulcer. *PLoS Negl Trop Dis* 9(2):e0003477
30. Vogel M, Bayi PF, Ruf MT, Bratschi MW, Bolz M, Um Boock A et al (2016) Local heat application for the treatment of Buruli ulcer: results of a phase II open label single center non comparative clinical trial. *Clin Infect Dis* 62(3):342–350
31. Johnson RC, Sopoh GE, Barogui Y, Dossou A, Fourn L, Zohoun T (2008) Surveillance system for Buruli ulcer in Benin: results after four years. *Sante* 18(1):9–13
32. Kanga JM, Kacou ED, Kouame K, Kassi K, Kaloga M, Yao JK et al (2006) Fighting against Buruli ulcer: the Cote-d’Ivoire experience. *Bull Soc Pathol Exot* 99(1):34–38
33. Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, Okrah J, Asamoah K, Asiedu K et al (2002) Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. *Emerg Infect Dis* 8(2):167–170

4. Ackumey MM, Kwakye-Maclean C, Ampadu EO, de Savigny D, Weiss MG (2011) Health services for Buruli ulcer control: lessons from a field study in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6):e1187
5. Marion E, Carolan K, Adeye A, Kempf M, Chauty A, Marsollier L (2015) Buruli ulcer in South Western Nigeria: a retrospective cohort study of patients treated in Benin. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1):e3443
6. Ayelo GA, Anagonou E, Wadagni AC, Barogui YT, Dossou AD, Houezo JG et al (2018) Report of a series of 82 cases of Buruli ulcer from Nigeria treated in Benin, from 2006 to 2016. *PLoS Negl Trop Dis* 12(3):e0006358
7. Otuh PI, Soyinka FO, Ogunro BN, Akinseye V, Nwezza EE, Iseoluwa-Adelokiki AO et al (2018) Perception and incidence of Buruli ulcer in Ogun State, South West Nigeria: intensive epidemiological survey and public health intervention recommended. *Pan Afr Med J* 29:166
8. Yeboah-Manu D, Aboagye SY, Asare P, Asante-Poku A, Ampah K, Danso E et al (2018) Laboratory confirmation of Buruli ulcer cases in Ghana, 2008-2016. *PLoS Negl Trop Dis* 12(6):e0006560
9. Fyfe JA, Lavender CJ, Handasyde KA, Legione AR, O'Brien CR, Stinear TP et al (2010) A major role for mammals in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis* 4(8):e791
0. Bratschi MW, Ruf MT, Andreoli A, Minyem JC, Kerber S, Wantong FG et al (2014) *Mycobacterium ulcerans* persistence at a village water source of Buruli ulcer patients. *PLoS Negl Trop Dis* 8(3):e2756
1. Oluwasanmi JO, Itayemi SO, Alabi GO (1975) Buruli (Mycobacterial) Ulcers in Caucasians in Nigeria. *Brit J Plast Surg* 28(2):111–113
2. Monson MH, Gibson DW, Connor DH, Kappes R, Hienz HA (1984) *Mycobacterium ulcerans* in Liberia: a clinicopathologic study of 6 patients with Buruli ulcer. *Acta Trop* 41(2): 165–172
3. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, Le Gall P et al (2011) Geographic expansion of Buruli ulcer disease. *Cameroon Emerg Infect Dis* 17(3):551–553
4. Röltgen K, 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(7):e751
5. N'Krumah RTAS, Kone B, Cisse G, Tanner M, Utzinger J, Pluschke G et al (2017) Characteristics and epidemiological profile of Buruli ulcer in the district of Tiassale, south Cote d'Ivoire. *Acta Trop* 175:138–144
6. Barker DJ (1971) Buruli disease in a district of Uganda. *J Trop Med Hyg* 74(12):260–264
7. Bratschi MW, Bolz M, Minyem JC, Grize L, Wantong FG, Kerber S et al (2013) Geographic distribution, age pattern and sites of lesions in a cohort of Buruli ulcer patients from the Mape Basin of Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis* 7(6):e2252
8. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Scott JT et al (2004) *Mycobacterium ulcerans* disease: role of age and gender in incidence and morbidity. *Tropical Med Int Health* 9(12):1297–1304
9. Röltgen K, Bratschi MW, Pluschke G (2014) Late onset of the serological response against the 18 kDa small heat shock protein of *Mycobacterium ulcerans* in children. *PLoS Negl Trop Dis* 8(5):e2904
0. Ampah KA, Nickel B, Asare P, Ross A, De-Graft D, Kerber S et al (2016) A sero-epidemiological approach to explore transmission of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis* 10(1):e0004387
1. Johnson RC, Nackers F, Glynn JR, de Biurrun Bakedano E, Zinsou C, Aguiar J et al (2008) Association of HIV infection and *Mycobacterium ulcerans* disease in Benin. *AIDS* 22(7):901–903
2. Toll A, Gallardo F, Ferran M, Gilaberte M, Iglesias M, Gimeno JL et al (2005) Aggressive multifocal Buruli ulcer with associated osteomyelitis in an HIV-positive patient. *Clin Exp Dermatol* 30(6):649–651

53. Kibadi K, Colebunders R, Muyembe-Tamfum JJ, Meyers WM, Portaels F (2010) Buruli ulcer lesions in HIV-positive patient. *Emerg Infect Dis* 16(4):738–739
54. Komenan K, Elidje EJ, Ildevert GP, Yao KI, Kanga K, Kouame KA et al (2013) Multifocal Buruli Ulcer associated with secondary infection in HIV positive patient. *Case Rep Med* 2013:348628
55. Stienstra Y, van der Werf TS, van der Graaf WT, Secor WE, Kihlstrom SL, Dobos KM et al (2004) Buruli ulcer and schistosomiasis: no association found. *Am J Trop Med Hyg* 71(3):318–321
56. Capela C, Dossou AD, Silva-Gomes R, Sopoh GE, Makoutode M, Menino JF et al (2016) Genetic variation in autophagy-related genes influences the risk and phenotype of Buruli ulcer. *PLoS Negl Trop Dis* 10(4):e0004671
57. Bibert S, Bratschi MW, Aboagye SY, Collinet E, Scherr N, Yeboah-Manu D et al (2017) Susceptibility to *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) is associated with IFNG and iNOS gene polymorphisms. *Front Microbiol* 8:1903
58. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reyssset G, Garnier T et al (2007) Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res* 17(2):192–200
59. Yeboah-Manu D, Bodmer T, Mensah-Quainoo E, Owusu S, Ofori-Adjei D, Pluschke G (2004) Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens. *J Clin Microbiol* 42(12):5875–5876
60. Yeboah-Manu D, Danso E, Ampah K, Asante-Poku A, Nakobu Z, Pluschke G (2011) Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from swab and fine-needle-aspiration specimens. *J Clin Microbiol* 49(5):1997–1999
61. Williamson HR, Benbow ME, Campbell LP, Johnson CR, Sopoh G, Barogui Y et al (2012) Detection of *Mycobacterium ulcerans* in the environment predicts prevalence of Buruli ulcer in Benin. *PLoS Negl Trop Dis* 6(1):e1506
62. Vandelanootte K, Durnez L, Amisshah D, Gryseels S, Dodoo A, Yeboah S 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(2):191–194
63. Roltgen K, Pluschke G, Johnson PDR, Fyfe J (2017) *Mycobacterium ulcerans* DNA in bandicoot excreta in Buruli ulcer-endemic area, Northern Queensland. *Aust Emerg Infect Dis* 23(12):2042–2045
64. Durnez L, Suykerbuyk P, Nicolas V, Barriere P, Verheyen E, Johnson CR et al (2010) Terrestrial small mammals as reservoirs of *Mycobacterium ulcerans* in benin. *Appl Environ Microbiol* 76(13):4574–4577
65. Vandelanootte K, Jordaens K, Bomans P, Leirs H, Durnez L, Affolabi D et al (2014) Insertion sequence element single nucleotide polymorphism typing provides insights into the population structure and evolution of *Mycobacterium ulcerans* across Africa. *Appl Environ Microbiol* 80(3):1197–1209
66. Vandelanootte K, Meehan CJ, Eddyani M, Affolabi D, Phanzu DM, Eyangoh S et al (2017) Multiple introductions and recent spread of the emerging human pathogen *Mycobacterium ulcerans* across Africa. *Genome Biol Evol* 9(3):414–426
67. Bolz M, Bratschi MW, Kerber S, Minyem JC, Um Boock A, Vogel M et al (2015) Locally confined clonal complexes of *mycobacterium ulcerans* in two Buruli ulcer endemic regions of Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis* 9(6):e0003802
68. Ablordey AS, Vandelanootte K, Frimpong IA, Ahorfor EK, Amisshah NA, Eddyani M et al (2015) Whole genome comparisons suggest random distribution of *Mycobacterium ulcerans* genotypes in a Buruli ulcer endemic region of Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 9(3):e0003681
69. Lamelas A, Ampah KA, Aboagye S, Kerber S, Danso E, Asante-Poku A et al (2016) Spatiotemporal co-existence of two *Mycobacterium ulcerans* clonal complexes in the Offin River Valley of Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 10(7):e0004856
70. Doig KD, Holt KE, Fyfe JA, Lavender CJ, Eddyani M, Portaels F et al (2012) On the origin of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *BMC Genomics* 13:258

71. Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, Small PL (2003) Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infect Immun* 71(2):774–783
72. Scherr N, Gersbach P, Dangy JP, Bomio C, Li J, Altmann KH et al (2013) Structure-activity relationship studies on the macrolide exotoxin mycolactone of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis* 7(3):e2143
73. Mitja O, Marks M, Bertran L, Kollie K, Argaw D, Fahal AH et al (2017) Integrated control and management of neglected tropical skin diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 11(1):e0005136

**Open Access** This chapter is licensed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license and indicate if changes were made.

The images or other third party material in this chapter are included in the chapter's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the chapter's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder.



## **Chapitre 3. Cadre et méthodes**

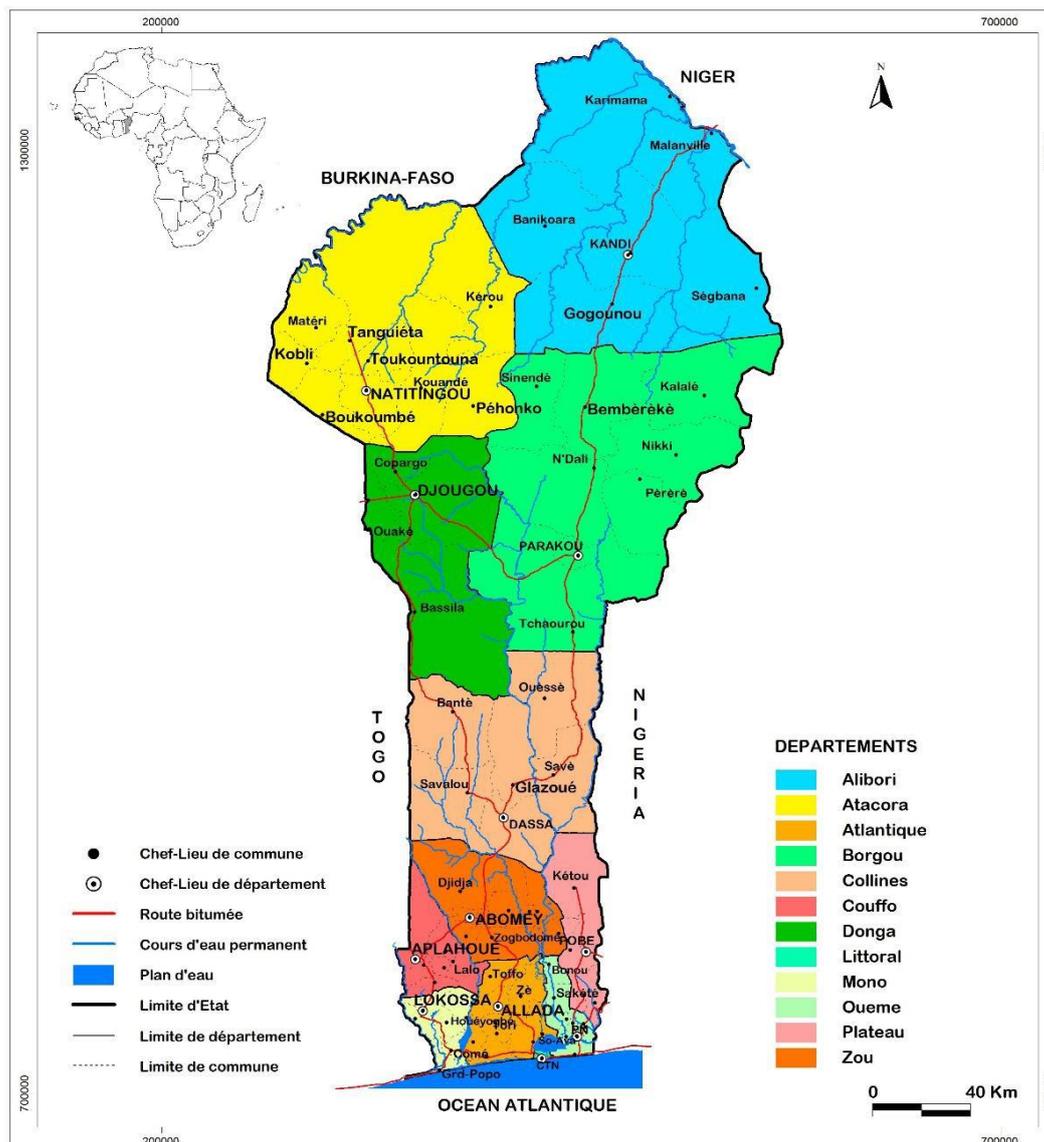
### **3. Cadre et méthodes**

#### **3.1 Cadre d'étude**

##### **3.1.1 Présentation du cadre d'étude**

L'étude s'est déroulée en République du Bénin (Figure 8), pays situé en Afrique Occidentale et sur le Golfe du Bénin. Le pays couvre une superficie de 114 763 Km<sup>2</sup> avec une population de plus de 12 millions d'habitants en 2021 et une densité de 109 habitants/Km<sup>2</sup> en 2020 [164]. Le taux de croissance démographique en 2021 est de 3,24% par an avec une espérance de vie de 62 ans en 2018. L'indice synthétique de fécondité selon l'enquête démographique et de santé 2017-2018, est de 5,7 enfants par femme. Le taux d'alphabétisation des adultes est de 42,4% en 2018. Le ratio emploi/population de plus de 15 ans et plus est de 60,5%. Les principales religions sont le vaudou, le christianisme, l'islam et autres mais la majorité de la population est chrétienne. Selon l'indice de développement humain en 2019, il était classé 158<sup>e</sup> sur 189 pays au monde. Le produit intérieur brut par habitant en 2020 est de 1250 dollars US et le Bénin est entré dans la catégorie des pays à revenu intermédiaire (tranche inférieure) [164]. Le taux d'inflation au niveau national au titre du mois de février 2021, suivant la définition adoptée dans l'espace UEMOA, est ressorti à +2,5%. Ce niveau bien que positif est en dessous du seuil de 3% fixé dans le cadre de la surveillance multilatérale au sein des Etats membres de l'UEMOA [164].

Il est divisé en 12 départements qui sont subdivisés en 77 communes. Ces dernières sont composées de 546 arrondissements. L'ensemble des arrondissements compte 3 747 villages et quartiers de villes [164]. Le contexte géomorphologique, climatique et hydrographique influence le profil épidémiologique du pays qui est caractérisé par une variété de pathologies tropicales avec une prédominance des affections endémo-épidémiques notamment le paludisme, le choléra et la méningite cérébro-spinale [165].



**Figure 8 : Carte administrative du Bénin représentant les douze départements**

Chaque commune, subdivisée en arrondissements, est dotée de la personnalité morale, de l'autonomie financière et gérée par des organes élus que sont le maire et le conseil communal/municipal. L'arrondissement est divisé en villages ou quartiers de ville. Chaque village ou quartier de ville constitue l'unité administrative de base autour de laquelle s'organisent la vie sociale et les activités de production. Il comprend, outre les zones d'habitation, l'ensemble des terres qui en constituent le patrimoine.

*Source : Enquête Démographique et de Santé 2017-2018, Rapport de synthèse*

### 3.1.2 Présentation du CDTLUB de Pobè

Au Bénin, le Programme National de Lutte contre la Lèpre et l'Ulcère de Buruli (PNLLUB) a pour mission de mettre en œuvre les mesures efficaces de lutte contre les Maladies Tropicales Négligées (MTN) à prise en charge et ou à manifestations cutanées notamment la lèpre et l'ulcère de Buruli. Le PNLLUB travaille au niveau départemental avec le Chef du Service Départemental de la Santé Publique (C/SDSP). Les Centres de Dépistage et de Traitement de l'Ulcère de Buruli (CDTUB) au nombre de quatre, sont sous tutelle technique du PNLLUB. Il s'agit des centres d'Allada, de Lalo, de Pobè (privé à but non lucratif), de Zagnanado (confessionnel). Les CDTUB travaillent en réseau avec les centres de santé en décentralisé.

Le Centre de Dépistage et de Traitement de la Lèpre et de l'Ulcère de Buruli (CDTLUB) de Pobè (Photo 6) couvre deux zones distinctes, la zone du plateau et la zone de l'Ouémé (au bord du fleuve) qui se différencient principalement par : des cours d'eau n'appartenant pas au même versant, des modes d'exploitation et d'occupation des sols différents, une origine ethnique différente des populations. Ces deux zones desservies communiquent assez peu.



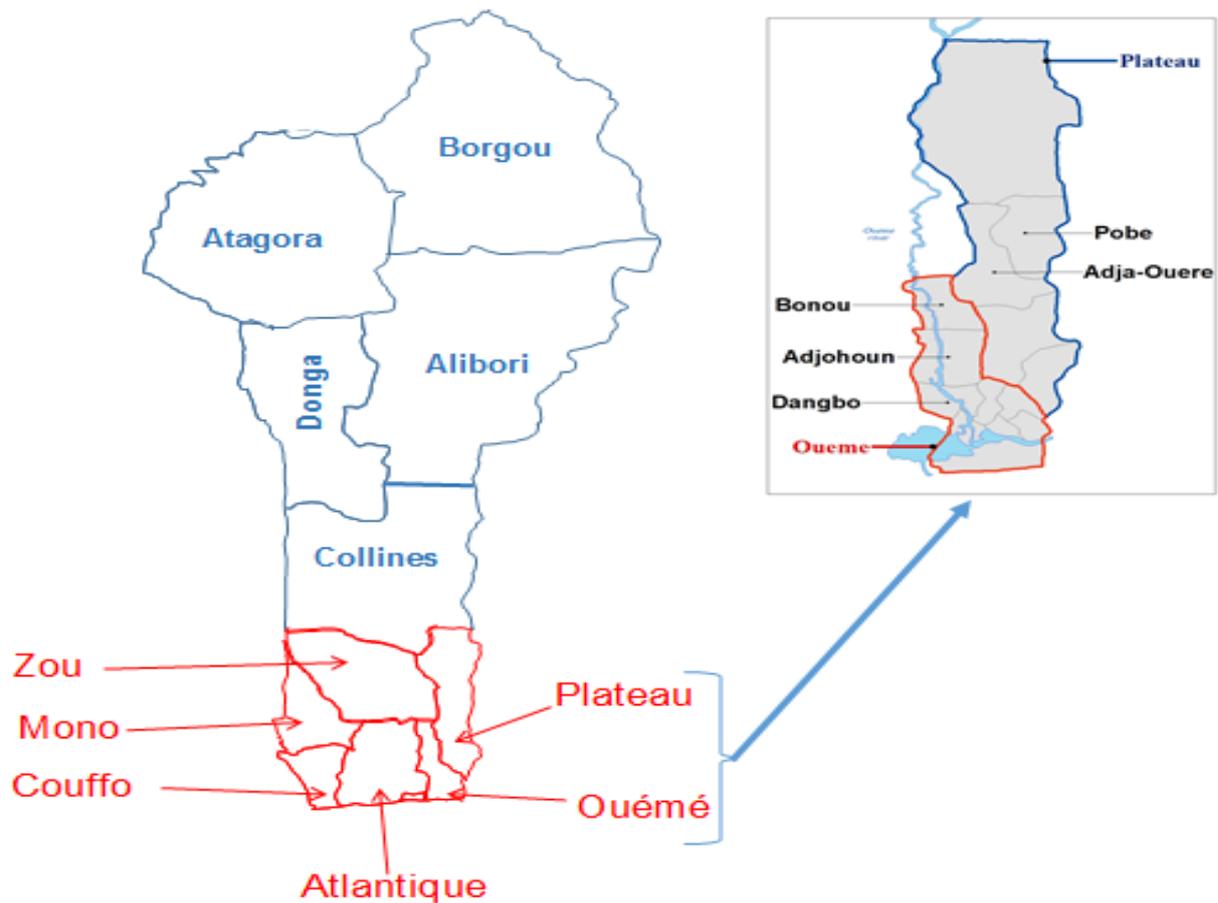
**Photo 6 :** Centre de Dépistage et de Traitement de la Lèpre et de l'Ulcère de Buruli de Pobè

### 3.1.3 Les sites d'étude

Ces deux zones desservies par le CDTLUB-Pobè communiquent assez peu mais bénéficient d'un accès aux soins comparable et la lutte contre l'ulcère de Buruli (en terme de campagne d'information, de dépistage actif de traitement et de suivi). Ces deux départements regroupent quatorze (14) communes dont Neuf (9) dans l'Ouémé (Porto-Novo, Sèmè-Kpodji, Dangbo, Bonou, Avrankou, Akpro-Missétété, Aguégués, Adjohoun et Adjarra) et cinq (5) dans le Plateau (Adja-Ouèrè, Ifangni, Kétou, Pobè et Sakété). Toutes les communes ayant au moins un cas d'ulcère de Buruli confirmé par PCR durant la période de l'étude ont été incluses dans l'étude. La carte ci-dessous (Figure 9) nous montre les sites d'étude avec les départements et communes les plus endémiques en rouge.

Par souci de comparabilité l'étude a été limitée aux seules communes endémiques d'ulcère de Buruli des départements de l'Ouémé et du Plateau. Tous ces sites ont été prélevés lors de la

mise en œuvre de l'étude environnementale si au moins un patient inclus dans l'étude épidémiologique déclare au moins avoir fréquenté l'un de ces derniers.



**Figure 9 : Carte du Bénin représentant les départements et les communes les plus endémiques de l'UB de 2006 à 2021**

### 3.2 Méthodes

Cette rubrique du chapitre sera décrite en fonction des différents axes de recherche de la thèse. Trois études successives et complémentaires ont été réalisées pour atteindre les objectifs. Il s'agit d'une étude première étude cas -témoins rétrospective sur les anciens patients de l'UB afin d'évaluer l'impact de l'utilisation de l'eau du forage sur la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli, dans la commune de Bonou, Ouémé. Une deuxième étude cas-témoins prospective à une échelle départementale sur tous les cas incidents d'UB afin d'identifier les facteurs de risque comportementaux associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli au Sud du Bénin a ensuite été réalisée. La troisième a permis d'évaluer le taux de contamination environnementale par *Mycobacterium ulcerans* (*Mu*) et d'analyser les interactions entre l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mu*.

### **3.2.1 Facteurs de risque comportementaux associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**

#### **Type d'étude**

Il s'agit d'une étude cas - témoins rétrospective et d'une étude cas-témoins prospective, menées au Bénin dans les communes endémiques des deux départements de l'Ouémé et du Plateau couverts par le CDTLUB de Pobè.

#### **Population d'étude**

- ✓ Pour l'étude cas - témoins rétrospective

La population cible est l'ensemble des adultes et enfants vivant dans la commune de Bonou, dans le département de l'Ouémé de 2005 à 2015.

- ✓ Pour l'étude cas - témoins prospective

La population cible est l'ensemble des adultes et enfants vivant dans les quatorze (14) communes des départements de l'Ouémé et du Plateau de 2018 à 2020.

Les critères d'inclusion des sujets

- ✓ Pour l'étude cas – témoins rétrospective

#### **Cas**

- Être ancien patient UB diagnostiqué au CDTLUB-Pobè entre 2005 et 2015,
- Être un résident de la commune de Bonou, trois mois au moins avant le début des lésions d'UB,
- Donner son consentement pour participer à l'étude.

#### **Témoins**

- Être un sujet vivant dans la même région que le patient depuis trois mois au moins mais n'ayant jamais eu de lésion UB,
- Avoir le même sexe que le cas,
- Avoir le même âge que le cas ou âge du cas  $\pm 1$ ,
- Avoir donné son consentement pour participer à l'étude.

- ✓ **Pour l'étude cas – témoins prospective**

#### **Cas**

- Avoir donné son consentement éclairé pour participer à l'étude,
- Avoir été dépisté, diagnostiqué et confirmé par PCR<sup>+</sup> UB par le CDTLUB-POBE pendant la période d'étude,

- Résider dans l'une des communes des deux départements de l'Ouémé et du Plateau depuis au moins six (6) mois avant janvier 2018, date du début de recrutement des cas,
- Absence de comorbidité.

### **Témoins**

- Avoir donné son consentement éclairé pour participer à l'étude,
- Ne pas avoir été dépisté, diagnostiqué et confirmé par PCR<sup>+</sup> UB par le CDTLUB-POBE pendant la période d'étude,
- Avoir le même sexe que le cas,
- Avoir le même âge que le cas ou âge du cas  $\pm 1$ ,
- Résider dans la même aire géographique que le patient depuis au moins six (6) mois avant janvier 2018, date du début de recrutement des cas,
- Être voisin du cas, amis ou membres de la famille du cas,
- Être de la même catégorie socioprofessionnelle que le cas.

### **Les critères de non inclusion des sujets pour les études**

Ne pas remplir au moins l'un des critères d'inclusion pour les cas et témoins

### **Périodes de recrutement**

Pour l'étude cas – témoins rétrospective, le recrutement a été réalisé du 12 Septembre 2016 au 20 Janvier 2017 parmi les anciens cas diagnostiqués et confirmés par PCR<sup>+</sup> au CDTULB-Pobè de 2005 à 2015. En ce qui concerne l'étude cas – témoins prospective, le recrutement s'est déroulé de Janvier 2018 à Décembre 2020, parmi tous les cas incidents dépistés, diagnostiqués et confirmés par PCR<sup>+</sup> UB CDTLUB-Pobè.

### **Méthodes et technique d'échantillonnage**

- ✓ Pour l'étude cas – témoins rétrospective

La méthode d'échantillonnage non probabiliste et la technique du choix raisonné ont été utilisées.

- ✓ Pour l'étude cas – témoins prospective

La méthode d'échantillonnage probabiliste et la technique du choix exhaustif de tous les cas ayant remplis les critères d'inclusion ont été utilisées.

## **Techniques et outils de collecte des données**

Les techniques de collecte de données utilisées sont l'enquête et l'entretien. Les outils de collecte qui ont été utilisés sont le questionnaire (en annexe), un guide d'entretien individuel et un guide d'entretien de groupe.

## **Procédure de collecte des données**

Lors de la visite de terrain, les sujets (cas et témoins), après avoir donné leur consentement oral, subissaient un entretien. Le recrutement de deux témoins par cas était réalisé afin d'obtenir un rapport cas-témoins de 1:2.

Les témoins ont été appariés individuellement en fonction de l'âge, du sexe et de la profession si possible. Une procédure systématique de porte à porte a été mise en place pour la sélection des témoins. Pour chaque cas, leur lieu de résidence était pris comme point de départ, et pour la suite on évolue selon une direction aléatoire.

La procédure de la direction aléatoire de notre étude a été adaptée des méthodes détaillées des enquêtes de l'OMS [2, 12, 166] qui est facile à mettre en œuvre lors des investigations sur le terrain en milieu rural. Toute la maison du cas est ensuite visitée, celles plus proches de son lieu de résidence afin de répertorier tous les sujets membres de ces ménages qui pourraient être de témoins potentiels qui remplissaient les critères d'appariement. Chaque fois que plusieurs sujets appropriés ont été identifiés, le sujet le plus proche en âge du cas (âge du cas  $\pm 1$ ) était choisi. La procédure a été répétée jusqu'à ce que deux témoins appropriés soient identifiés. Les témoins ont été examinés pour exclure la possibilité d'un ulcère de Buruli actif ou guéri.

Étant donné la forte proportion d'analphabétisme parmi les habitants des zones endémiques, qui sont rurales, le consentement éclairé oral a été obtenu des adultes (cas et témoins) ou des parents (ou tuteurs légaux) des mineurs (cas et témoins), en présence de l'agent de santé (infirmière) en tant que témoin, avant l'inscription et le recrutement pour l'étude. La participation à l'étude était volontaire et tous les sujets étaient libres de se retirer de l'étude à tout moment sans donner aucune explication.

Afin d'éviter des biais majeurs dans l'estimation des mesures d'association, la constitution du bon groupe de comparaison (non exposés ou témoins) a été réalisée suivant les critères très précis. Le groupe témoin était représentatif de la population d'où proviennent les cas, en particulier vis-à-vis de l'exposition étudiée. Les témoins ont été appariés individuellement aux cas. Plusieurs sources de témoins parmi les proches des cas ont été utilisées à savoir : les voisins, les amis du patient ou les membres de la famille du patient. On s'assurait toujours avant tout

recrutement de témoins que « les témoins auraient été des cas dans notre étude s'ils avaient développé la maladie d'intérêt ».

### **Taille de l'échantillon**

Pour l'étude cas – témoins rétrospective, un total de 106 cas et 212 témoins appariés sur l'âge et le sexe ont été recrutés. Quant à l'étude cas – témoins prospective, 111 cas ont été recrutés avec 222 témoins appariés sur l'âge, le sexe et la profession si possible.

### **Variables de l'étude**

La variable dépendante de l'étude est la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dichotomisée avec comme modalités : présence ou absence de l'UB.

Les principales variables indépendantes étudiées sont les facteurs comportementaux et environnementaux. Il s'agit des habitudes de vie et usages de l'eau des patients comparés aux témoins, les lieux fréquentés par ces derniers en fonction des usages de l'eau (cuisine, lavage, boisson, lessive, etc.). Les points d'approvisionnement en eau (fleuve, forage, ruisseau, fontaine, autres points d'eau non protégés) et la fréquence sur ces lieux ont été aussi étudiés. Les éventuels changements saisonniers (crue, sécheresse, déplacement des patients) et les activités agricoles (type de culture, modifications des pratiques agraires, mutations agraires) ont été enfin étudiés.

### **Traitement et analyse des données**

La première étape de l'analyse a été de s'assurer que les informations recueillies au cours de l'étude puis informatisées ne comportent pas d'erreurs. Toutes les données ont été analysées à l'aide des logiciels d'analyse statistique XLSTAT 2021.1.1, Stata/SE 11.0 software (Stata Corporation, College Station, USA), SPHINX iQ 2 et R version 3.6.1

La population de l'étude a été décrite selon les caractéristiques socio-démographiques et comportementales ainsi que selon le statut cas/témoins des sujets recrutés.

Les variables continues présentant une distribution normale ont été décrites en utilisant des moyennes avec leurs écarts-types, tandis que celles dont la distribution n'était pas normale ont été décrites par leurs médianes, valeurs minimales, maximales et intervalles interquartiles. Les variables catégorielles ont été décrites en utilisant des proportions. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test t de Student alors que les médianes ont été comparées en utilisant le test de Wilcoxon ou le test U de Mann-Whitney. Les proportions ont été comparées en utilisant le test chi-carré de Pearson ou le test exact de Fisher, selon le cas.

Les cas et témoins étant appariés individuellement, la régression logistique conditionnelle, dans laquelle l'unité statistique est définie par un triplet constitué du cas et de deux témoins qui lui sont appariés a été utilisée.

Après l'analyse brute et stratifiée portant sur les variables, une analyse univariée a été réalisée entre chacune des variables indépendantes et la variable dépendante. Les OR uni variés et leurs intervalles de confiance à 95% (IC à 95%) ont été estimés pour chaque variable.

Pour l'analyse multivariable, nous avons retenu les variables pour lesquelles le degré de signification des tests statistiques est inférieur à 25% en uni variée. La procédure pas à pas descendante a été utilisée. Le test de Wald a été utilisé pour tester la significativité statistique des variables. Les interactions ont été testées en introduisant des termes d'interaction dans le modèle.

A l'issue de la procédure de sélection des variables dans le modèle final, l'adéquation du modèle a été vérifiée grâce au test de Hosmer et Lemeshow.

### **3.2.2 La répartition spatiale de *Mu* dans l'environnement par la réalisation d'étude écologique**

#### **Type d'étude**

Il s'agit d'une étude écologique, utilisant les données agrégées des cas incidents d'UB au niveau des départements de l'Ouémé et du Plateau et les principaux sites de points d'eau non protégés fréquentés par les patients recrutés dans l'étude cas – témoins prospective.

#### **Population d'étude**

La cible est représentée par tous les points d'eau non protégés fréquentés par les patients recrutés dans l'étude cas – témoins prospective

#### **Critères d'inclusion**

- Être un point d'eau non protégé fréquenté par au moins un patient dans la période d'étude,
- Être accessible,
- Être autorisé par les autorités locales à prospecter le point d'eau.

#### **Critères de non inclusion**

Ne pas respecter au moins un des critères d'inclusion.

## **Périodes de prélèvement des échantillons**

Les prélèvements des échantillons se sont déroulés de Janvier 2018 à Décembre 2020.

## **Méthode et technique d'échantillonnage**

La méthode d'échantillonnage non probabiliste et la technique du choix raisonné ont été utilisées.

## **Technique et outils de collecte des échantillons**

La technique de collecte des échantillons utilisée est le prélèvement. Les outils de collecte sont les matériels de prélèvement dans les points d'eau non protégés.

## **Procédure de collecte des échantillons**

Lors de la mise en œuvre de l'étude cas – témoins prospective, des prélèvements simultanés sur les principaux sites aquatiques que les patients ont fréquentés avant de développer la maladie, ont été effectués. Les sources d'eau naturelles principales et / ou secondaires utilisées par les patients ont été ainsi échantillonnées. L'échantillonnage aquatique a été effectué avec les mêmes méthodes sur chaque site. Tous les invertébrés aquatiques et les poissons ont été capturés par une épuisette (maille de filet inférieur à 1 mm) de la surface jusqu'à une profondeur de 0,2 à 1 m, sur une distance de 1 m. Les punaises ont été séparées des autres invertébrés. Tous les insectes ont été conservés dans des tubes Falcons contenant de l'éthanol à 70 % pour identification en laboratoire.

En plus des invertébrés aquatiques, pour chaque point d'eau, des échantillons des trois principales plantes aquatiques ont été prélevés. Chacun de ces échantillons de plantes se composait d'une à cinq feuilles, tiges ou racines végétales, selon la taille de l'échantillon. Ils ont été placés directement dans une bouteille propre de 100 mL contenant 70% d'éthanol.

## **Taille de l'échantillon**

Au total, 90 sites d'échantillonnage ont été recensés dans les communes endémiques des départements de l'Ouémé et du Plateau. Un total de 815 pools triés par familles ont été obtenus sur les sites identifiés et prélevés.

## **Variables de l'étude**

La variable dépendante de l'étude est la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dichotomisée avec comme modalités : présence ou absence de l'UB.

La variable indépendante étudiée est la confirmation biologique de la présence de *Mu* dans l'environnement aquatique par Qpcr.

### **Traitement et analyse des échantillons**

Des pools de 10 invertébrés ont été ensuite réalisés et une recherche d'ADN de *Mu* a été réalisée par PCR quantitative sur les broyats tissulaires.

- **Extraction et purification de l'ADN**

Les échantillons ont été transférés dans des tubes de battage de billes (billes d'acier de 3 mm) contenant 3 mL de PBS 1X et ont été agités avec TissueLyser (Qiagen) pendant 10 min à 30 Hz. Ils ont ensuite été transférés dans un tube de 50 mL et centrifugés à 420 x g pendant 1 min pour éliminer les débris de cellules hôtes. Le surnageant a été transféré dans un autre tube de 50 mL et centrifugé à 4 600 x g pendant 30 min pour culotter les bactéries. Le surnageant a été jeté et le culot a été mis en suspension dans 750 µL de tampon de lyse, transféré dans des tubes à billes (ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, Zymo Research) puis agité avec TissueLyser (Qiagen) pendant 10 min à 30 Hz pour lyser les bactéries. L'ADN a été extrait selon le protocole du fabricant et dilué dans 50 µL d'eau exempte de RNase-DNase.

- **Test de positivité par la technique Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)**

Les séquences d'amorce oligonucléotidique et de sonde TaqMan ont été sélectionnées parmi les séquences GenBank IS2404 et le domaine kétoréductase B (KR) du gène mycolactone polykétide synthase (mks) à partir du plasmide pMUM001. La qPCR a été réalisée dans un volume de réaction de 20 µl contenant un mélange de qPCR, des amorces 300 nM, une sonde Taqman 100 nM et 5 µl d'ADN ou d'eau stérile comme contrôle négatif.

Les réactions ont été effectuées sur un thermocycleur AriaMx (Agilent), avec le programme suivant : 10 min à 95 ° C et 40 cycles de 15 s à 95 ° C et 1 min à 60 ° C. Des dosages de lecture quantitative ont été mis en place, basés sur une courbe standard externe avec l'ADN de *Mu* dilué en série sur 6 logs.

Les échantillons étaient considérés comme positifs uniquement si la séquence IS2404 et la séquence du gène codant pour le domaine de la kétoréductase B (KR) de la mycolactone polykétide synthase étaient détectées, avec des valeurs de cycle seuil (Ct) strictement <36 cycles.

### **3.2.3 Interaction entre l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mu***

Nous avons analysé les interactions entre les fréquentations des zones endémiques, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mu* par la triangulation des résultats d'études épidémiologique, environnementale et de la géographie de la santé.

### **3.2.4 Considérations éthiques et consentement éclairé**

Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé (CNERS) du Bénin et la direction générale des eaux, forêts et chasse pour la collecte des vertébrés, invertébrés et plantes aquatiques (Annexes). Tout le personnel impliqué dans l'étude, y compris les agents communautaires, était initié à l'éthique de la recherche. Toutes les données sont anonymes et les participants ont été informés que les résultats seront publiés dans des revues scientifiques. Le consentement éclairé écrit/oral selon le cas a été obtenu chez tous les participants à l'étude (Annexes).

**Chapitre 4. Effect of well drilling on Buruli ulcer incidence in Benin :  
a case-control, quantitative survey**

**Authors and affiliations :** <sup>1,2</sup>Horace Degnonvi\*, <sup>3</sup>Sébastien Fleuret\*, <sup>2</sup>Clément Coudereau, <sup>4</sup>Ronald Gnimavo, <sup>3</sup>Sigrid Giffon, <sup>5</sup>Edouard Yeramian, <sup>1</sup>Roch Christian Johnson\*, <sup>2</sup>Estelle Marion\*

1. Centre Inter Facultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable, Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin

2. Centre de recherche en cancérologie et immunologie Nantes-Angers, French National Institute of Health and Medical Research, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

3. Centre national de la recherche scientifique, UMR Espaces et Sociétés, Université d'Angers, Angers, France

4. Centre de Diagnostic et de Traitement de la lèpre et de l'ulcère de Buruli, Fondation Raoul Follereau, Pobè, Benin

5. Unité de microbiologie structurale, Institut Pasteur, Centre National de Recherche Scientifique, Université de Paris, Paris, France

\* Corresponding author. Contributed equally

Dr Estelle Marion, Centre de recherche en cancérologie et immunologie Nantes-Angers, French National Institute of Health and Medical Research, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers 49000, France, 4 rue Larrey, 49033 Angers Cedex 01, France. Tel : +33 2 41 35 34 72 ; fax : +33 2 41 35 41 64. E-mail address : estelle.marion@inserm.fr

**Cet article a été publié en libre accès dans la revue « The Lancet Planetary Health » le 21 Août 2019.**

## **RESUME**

### **Contexte**

L'ulcère de Buruli est la troisième maladie mycobactérienne la plus répandue dans le monde. Le fardeau de santé publique de cette maladie tropicale négligée est important dans les régions pauvres de l'Afrique. Le développement des stratégies préventives est entravé par une compréhension incomplète de l'épidémiologie et de la transmission de la maladie. Les facteurs de risque ou de protection peuvent différer d'une région à une autre, et pourraient être environnemental, socio-économique ou comportemental. Une meilleure accessibilité à l'eau potable, à travers les forages de puits pourrait être un facteur protecteur.

Notre but était d'étudier les impacts de l'utilisation de l'eau des forages de puits sur la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dans une zone définie.

### **Méthodes**

Il s'agit d'une étude cas-témoins appariée avec une méthode de recueil mixte qui a porté sur des anciens cas de l'ulcère de Buruli dépistés et confirmés par PCR-UB au Centre de Dépistage et de Traitement de Lèpre et de l'Ulcer de Buruli (CDTLUB) de POBE. Lors de cette étude quantitative, nous avons obtenu des données de terrain sur l'incidence de l'ulcère de Buruli sur une période de 10 ans au CDTLUB-POBE. Les données de forage de puits ont été aussi recueillies auprès du ministère de l'Énergie, Eau et Mines et les coordonnées géographiques ont été obtenues lors des visites de sites. L'étude cas-témoins a ensuite été réalisée pour étudier le rôle de l'utilisation de l'eau de puits dans la protection contre l'ulcère de Buruli.

### **Résultats**

La principale activité socio-économique des personnes atteintes de l'ulcère de Buruli incluses dans l'étude était l'agriculture de subsistance. Nous avons trouvé une forte corrélation inverse entre l'incidence de l'ulcère de Buruli et le nombre de nouveaux puits de forage dans la commune de Bonou ( $r^2 = 0.8818$ ). Les analyses de régression logistique conditionnelle sur 106 cas et 212 témoins ont montré que l'accès et l'utilisation régulière de l'eau des puits de forage pour se laver, se baigner, boire ou cuisiner protégeaient contre l'ulcère de Buruli (Odds ratio ajusté = 0,1 ; IC à 95% [0,04 – 0,44] ;  $p = 0,0012$ ).

### **Interprétation**

Cette étude ouvre de nouvelles possibilités pour développer une politique efficace et abordable de lutte contre la maladie à une échelle géographique substantielle. L'étude montre que l'accès à l'eau protégée est un moyen efficace pour réduire l'incidence de l'ulcère de Buruli et, par conséquent pourrait servir de base pour un contrôle de cette affection.

## Effect of well drilling on Buruli ulcer incidence in Benin: a case-control, quantitative survey

Horace Degronvi\*, Sébastien Fleuret\*, Clément Coudreau, Ronald Gnimava, Sigrid Giffon, Edouard Yeremian, Roch Christian Johnson\*, Estelle Marion\*



### Summary

**Background** Buruli ulcer is the third most common mycobacterial disease worldwide. The public health burden of this neglected tropical disease is large, particularly in poor areas of west and central Africa. The development of appropriate preventive strategies is hampered by an incomplete understanding of the epidemiology and transmission of the disease. We investigated the effect of the drilling of wells on Buruli ulcer incidence.

**Methods** In this case-control, quantitative survey, we obtained field data for Buruli ulcer incidence over a 10-year period from a specialised centre that collected data for the Ouémé and Plateau departments in Benin, and data for well drilling from the Ministry of Energy, Water and Mines in Benin. The coordinates of the wells drilled were obtained during site visits. A case-control study was then done to investigate the role of well water use in protecting against Buruli ulcer.

**Findings** We found a strong inverse correlation between the incidence of Buruli ulcer and the number of new wells drilled in the Bonou municipality ( $r^2=0.8818$ ). A case-control study (106 cases and 212 controls) showed that regular use of the water from the wells for washing, bathing, drinking, or cooking was protective against Buruli ulcer (adjusted odds ratio 0.1, 95% CI 0.04–0.44;  $p=0.0012$ ).

**Interpretation** This study opens up new possibilities for developing an effective yet affordable policy to fight the disease on a substantial geographical scale. Our study shows that providing access to protected water is an efficient and feasible way to reduce the incidence of Buruli ulcer.

**Funding** Fondation Française Raoul Follereau, French National Institute of Health and Medical Research, and Région Pays de Loire.

**Copyright** © 2019 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an Open Access article under the CC BY 4.0 license.

### Introduction

Buruli ulcer is caused by *Mycobacterium ulcerans*. The infection is characterised by painless cutaneous lesions leading to scarring, contracture deformities, amputations, and disabilities if left untreated.<sup>1</sup> Despite its discovery more than a century ago and its spread since the 1980s, Buruli ulcer remains one of the most neglected tropical infectious diseases. It is the third most common mycobacterial disease in the world after tuberculosis and leprosy. Most cases are reported in west Africa, and Benin is one of the countries in which endemicity is highest.

A key epidemiological feature of this disease is the distribution of cases in very well delimited foci. It typically occurs in poor rural communities with little economic or political influence. All epidemiological studies have shown that environmental changes (eg, deforestation, wetland creation) favour the spread of the disease.<sup>2–4</sup> The main reservoir of *M. ulcerans* seems to be environmental, but the precise mode of transmission remains unknown, explaining descriptions of the condition as emerging from obscurity or as a mysterious disease.<sup>5</sup> Since the outbreak of the disease in the Buruli district of Uganda in the 1970s, the consensus view has

been that human-to-human transmission does not occur. Field studies have shown a direct association between *M. ulcerans* infection and swampy areas, and have identified aquatic environments as the main reservoir of the bacillus, as for most environmental mycobacteria. In this context, the main risk factor identified to date is close contact with unprotected water (eg, rivers, lakes, swampy areas),<sup>6–10</sup> with the inoculation of the bacillus in cutaneous tissue required for disease development.<sup>11</sup> It has also been suggested that urbanisation might result in a reduced likelihood of becoming infected with *M. ulcerans*,<sup>12,13</sup> by reducing access to unprotected water or providing easier access to protected water sources.

Since 2010, the number of new cases of Buruli ulcer has decreased in several countries in which this disease is endemic, including Benin (appendix pp 1–2). Surprisingly, no epidemiological study has been done to identify the factors underlying this decrease in Buruli ulcer incidence, but several hypotheses have been put forward,<sup>14–17</sup> including: (1) the exhaustive diagnosis of chronic and active cases combined with active screening and treatment campaigns since 2007; (2) changes to the environmental reservoir of *M. ulcerans*; (3) the introduction of medical treatments (antibiotics), suggesting

Lancet Planet Health 2019;

3: e349–56

\*Contributed equally

Centre Inter Facultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable, Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin

(H Degronvi MS,

R C Johnson PhD); Centre de

recherche en cancérologie et

immunologie Nantes-Angers,

French National Institute of

Health and Medical Research,

Université de Nantes,

Université d'Angers, Angers,

France (H Degronvi,

C Coudreau PhD,

E Marion PhD); Centre national

de la recherche scientifique,

UMR Espaces et Sociétés,

Université d'Angers, Angers,

France (S Fleuret PhD,

S Gilson MS); Centre de

Diagnostic et de Traitement de

la lèpre et de l'ulcère de Buruli,

Fondation Raoul Follereau,

Pobé, Benin (R Gnimava MD);

and Unité de microbiologie

structurale, Institut Pasteur;

Centre National de Recherche

Scientifique, Université de

Paris, Paris, France

(E Yeremian PhD)

Correspondence to:

Dr Estelle Marion, Centre de

recherche en cancérologie et

immunologie Nantes-Angers,

French National Institute of

Health and Medical Research,

Université de Nantes, Université

d'Angers, Angers 49000, France

estelle.marion@traum.fr

**Research in context****Evidence before this study**

We searched PubMed, without language restrictions, for articles published from database inception up until Dec 30, 2018, using the search terms "Buruli ulcer" OR "Mycobacterium ulcerans" AND "Epidemiology". 415 studies were identified and around 20 reported an association with contact with unprotected water sources (rivers) as the main risk factor for Buruli ulcer. Surprisingly, effects of well drilling on Buruli ulcer epidemiology have not been investigated in areas in which this disease is endemic, and the factors accounting for variations of Buruli ulcer incidence have not been identified, despite the decrease in the number of new cases observed in most African countries (Côte d'Ivoire, Ghana, Benin) in which Buruli ulcer is endemic.

**Added value of this study**

This study provides the first evidence, to the best of our knowledge, that the installation of wells can protect against Buruli ulcer in areas of endemic disease. We analysed a large cohort of laboratory-confirmed cases of Buruli ulcer (Pobè, Benin) over a 10-year period, including 1365 PCR-confirmed cases. We found that well drilling was strongly associated with a decrease in Buruli ulcer incidence in an area of endemic disease

in Benin between 2006 and 2012. We also identified well drilling as a protective factor for the population in a case-control study. Our study provides quantitative demonstration of the impact of a clearly identified factor, well drilling, on the incidence of Buruli ulcer. As such, this identification provides operational means for the control of the disease by acting on the identified environmental factor. More generally speaking, this study is one of the rare reports showing the positive impact of well drilling installation in the field of neglected tropical diseases, with possible implications for other fields.

**Implications of all the available evidence**

The present study provides rationale for firm yet affordable public policies to be implemented at large scales in the affected areas, encouraging the drilling of wells to reduce the incidence of the disease. Accumulation of feedback data for the intervention should provide increasingly more accurate information on the optimal location for the well drilling, and integrating parameters relative to various underlying social aspects. Such voluntary policies should, in return, also provide valuable information concerning the fundamental aspects of the epidemiology of the disease.

a role for humans as a reservoir of the bacterium; and (4) a decrease in high-risk activities involving contact with *M. ulcerans*, due to the use of protected water sources.

The identification of plausible protective factors against Buruli ulcer is crucial for the prevention and control of this disease. Protective factors might differ between regions, and could be environmental, socioeconomic, or behavioural. The main goal of this study was to investigate the effect of the drilling of new wells on the incidence of Buruli ulcer in a defined area, to determine whether well drilling, which provides the population with better access to protected water, could serve as a basis for effective disease control.

**Methods****Study design and epidemiological data sources**

We retrospectively obtained quantitative data. Epidemiological data for Buruli ulcer in Benin were collected from the annual statement of the four Centres for Leprosy and Buruli Ulcer Treatment and Diagnostics (CDTLUBs), as part of the National Control Program for Leprosy and Buruli Ulcer in Benin. The widespread locations of the four centres makes it possible to do continuous active surveys, to establish disease burden, and to provide the most appropriate care for each patient. Furthermore, it makes it possible to collect high-quality epidemiological data, as highlighted by many published epidemiological studies.<sup>2,3</sup>

Information about well drilling (dates and sites) was obtained from the Ministry of Energy, Water and Mines of Benin (Voullamoz J-M, Institut de recherche pour le

développement, personal communication). Coordinates were obtained for each well drilled in the departments of Ouémé and Plateau, with a hand-held global positioning system receiver (Garmin GPSMAP-62sc; Olake, KS, USA).

Patient data were collected at the CDTLUB-Pobè, where all epidemiological records for the patients with Buruli ulcer from the Ouémé and Plateau departments (administrative areas approximately equivalent to a county) are archived. Data collection was approved by the institutional review board of the CDTLUB and the national Beninese Buruli ulcer control authorities (IRB00006860), as well as the ethics committee of the university hospital of Angers, France (Comité d'Éthique du CHU d'Angers). Buruli ulcer cases were defined on the basis of the WHO clinical definition, with a confirmation by PCR. Sociodemographic variables (ie, age, sex, village or city of residence) were also collected for the patients with Buruli ulcer. The annual incidence of the disease in the community and the ratio of the number of wells drilled to the number of inhabitants were calculated from the 2012 census data. Ethical approval to use these data was not required by the National Control Program for Leprosy and Buruli Ulcer.

**Participants for the case-control study**

Buruli ulcer cases for the case-control study were defined as any patient diagnosed with Buruli ulcer, treated at the CDTLUB-Pobè and living in Bonou at the time of diagnosis, between 2005 and 2015. Patients were not excluded from enrolment on the basis of age or sex.

The study protocol aimed to recruit two controls per case to obtain a case control ratio of 1:2. Neighbourhood

controls were individually matched on the basis of age and sex. A door-to-door systematic procedure was implemented for control selection. For any given case, we took their house as a starting point; we then continued in a random direction. The random walking procedure described in our study was adapted from the methods detailed in a WHO survey<sup>20</sup> and is easy to implement during field investigations in rural areas. We then visited the nearest house and listed all members of the household to identify the potential controls who fulfilled the matching criteria. Whenever several suitable individuals were identified, we chose the individual closest in age (within 1 year) to the case. The procedure was repeated until two suitable controls were identified. Controls were examined to rule out the possibility of an active or healed Buruli ulcer.

All the individuals included, or their parents or guardians (for minors aged less than 18 years) received information about the aims of the study. Given the high proportion of illiteracy among the rural inhabitants of Bonou, oral informed consent was obtained from adults (cases and controls) or from the parents (or legal guardians) of minors (cases and controls), in the presence of the health worker (nurse) as a witness, before enrolment and interview. We also obtained authorisation for data collection from the medical officers and heads of the six districts in Bonou. Participation was voluntary and the individuals were free to withdraw from the study at any time.

#### Questionnaire design

The questionnaire developed for data collection in the case-control study was tested on a preliminary sample of patients and controls. After this preliminary testing, improvements were made and the questionnaire was then validated for the collection of data concerning sociodemographic status (eg, age, sex, education, region of residence, professional activities, among others), and activities involving contact with water (eg, washing, bathing, swimming, drinking, or cooking with river water or well water). The questionnaire was written in French, and then translated into local languages when read aloud to participants. During the interviews, questions were asked focusing on the time of the illness for the patient. The two controls were interviewed on their behaviour during this time. The questions also included water contact and changes in behaviour over time. The interviews were designed to identify the targeted periods and give benchmarks over time to minimise biases when doing the study.

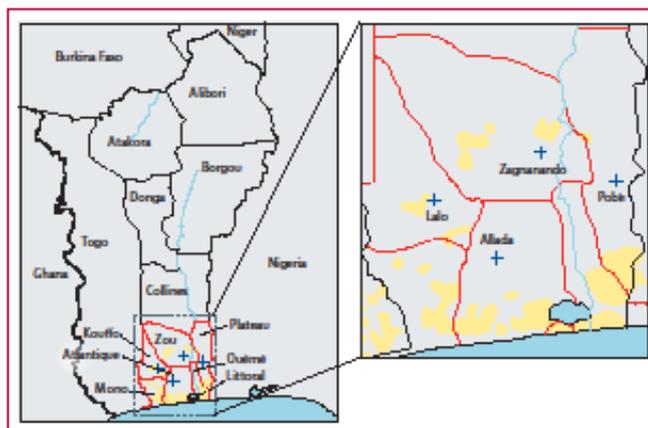
#### Data collection for the case-control study

The limited number of patients in each district and the modifiable areal unit problem (aggregation) acted as major sources of statistical bias with a substantial effect on the analysis. Indeed, a correlation observed at the district level might not be visible at finer scales (depending on where area borders are drawn).<sup>21</sup>

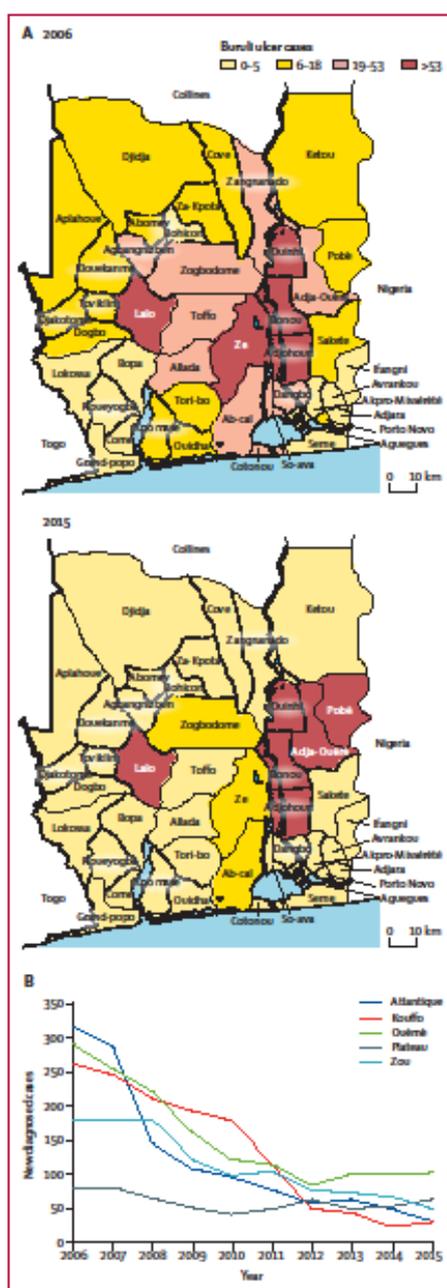
Consequently, in accordance with the incidence of Buruli ulcer in Bonou municipality, the distribution of cases in the various districts over the 10-year-period (2006–15) was proportional during recruitment, to attain the finest possible spatial scale with the highest possible resolution of incidence data. The sample was stratified as previously described,<sup>22</sup> and the data were analysed at the scale of the municipality. In each district of Bonou, the research team met the district medical officer, who introduced them to the heads of district and the nurses in charge of Buruli ulcer treatment in the villages. The research team and the nurse then went to meet the patients with Buruli ulcer at their place of residence or work. A questionnaire, either in French or translated into one of the local languages (ie, Goun or Nago), was read aloud to participants and completed in front of them. In the field, geographical coordinates were collected for the sites of human contact with water. These coordinates were obtained with the aforementioned hand-held global positioning system receiver. We calculated the Euclidean distance (shortest point-to-point distance) between the drilling site, the main bodies of water at which contact between humans and water occurred, and the places of residence and work of the patients, with ArcGIS version 10. The various maps were constructed from field surveys and from diverse data sources (OpenStreetMaps, Google Earth, Shuttle Radar Topography Mission, Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique du Bénin).

#### Statistical analysis

Quality control was systematically done for all the data collected on questionnaires. Diagnoses of Buruli ulcer



**Figure 1.** Departments of Benin in which Buruli ulcer is endemic and locations of the four CDTLUBs. Buruli ulcer is endemic to seven (outlined in red) of the 12 departments of Benin. All seven are located in the south of the country (Zou, Mono, Kouffo, Atlantique, Littoral, Ouémé, and Plateau). Four specialised CDTLUBs (CDTLUB-Lalo, CDTLUB-Allada, CDTLUB-Pobè, and CDTLUB-Zagnanado) have been set up in the areas of endemic disease, for the diagnosis and treatment of Buruli ulcer. Maps were created from Buruli ulcer data collected from the National Control Program for Leprosy and Buruli Ulcer. Blue crosses indicate CDTLUBs. CDTLUBs=Centres for Leprosy and Buruli Ulcer Treatment and Diagnosis.



was the dependent variable, and sociodemographic status and activities leading to contact with water were independent variables. All variables are expressed as proportions.

Univariate odds ratios (ORs) and 95% CIs were estimated for each variable using a conditional logistic regression model (to account for the matched design) and significance was assessed with the Wald test. Interactions were tested by introducing interaction terms in the model. Variables with  $p < 0.20$ , except informal workers and frequency of river visits variables, were entered into a multivariate conditional logistic regression model to simultaneously examine their independent effect. The final model was obtained through stepwise deletion of variables until all predictors left had  $p < 0.05$ . The two variables of informal workers and frequency of river visits were not included to avoid potential confounding effects because these variables change according to several factors (eg, rainy season or dry season, flooding or recession of river water, and professional activities such as the type of employment). Data were processed and analysed using EpiInfo version 7.1.3.3.3 and Stata/SE version 11.0.

**Role of the funding source**

The funders of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

**Results**

The fight against Buruli ulcer in Benin is organised around four Buruli ulcer hospitals or CDTLUBs (figure 1). Between 2006 and 2015, 6051 Buruli ulcer cases were reported in Benin with the highest endemicity in Ouémè (1555 patients, 26% of total cases; appendix p 3). The number of new cases reported per year has decreased by 74%, from 1195 in 2006 to 311 in 2015 (figure 2). After 2012, the decrease slowed and the number of new cases stabilised. By contrast, the number of new cases in Plateau remained low and stable, and thus displayed a different pattern of change over the 2006 to 2015 period (figure 2B).

The Ouémè and Plateau departments are covered by the CDTLUB-Pobè. Between 2006 and 2015, the hospital diagnosed and treated 1365 patients: 946 (69%) patients from Ouémè and 419 (31%) patients from Plateau. Three of the nine municipalities in Ouémè (Adjohoun,

**Figure 2: Survey of Buruli ulcer in Benin (2006-15)**  
 Incidence of Buruli ulcer in all the areas in which this disease is endemic (A). New Buruli ulcer cases reported between 2006 and 2015 in the five departments with the highest levels of endemicity (B). Maps were created from Buruli ulcer data collected from the National Control Program for Leprosy and Buruli Ulcer.

Bonou, and Dangbo, which are located along the river) and two of the five in Plateau (Pobè and Adja-Ouèrè) were retained for analysis as they accounted for 94% of all cases (1283 patients; appendix p 4). During the 2006–15 period, the decrease in Buruli ulcer incidence in Ouémè was due to decreases in the two municipalities in which endemicity for Buruli ulcer was highest: Bonou and Adjohoun (appendix pp 3, 6). By contrast, Buruli ulcer incidence in Pobè and Adja-Ouèrè in Plateau was stable or fluctuated only slightly. We noted some differences in the epidemiological profile between municipalities, despite all the municipalities in these two departments having access to similar care and control measures for Buruli ulcer. This finding suggests that an environmental factor might underlie the decrease in the number of new Buruli ulcer cases in Ouémè.

During the 2006–12 period, substantially more new wells were drilled in Ouémè than in Plateau. The number of wells in Ouémè increased from 10.9 per 10 000 inhabitants in 2006 to 22.5 per 10 000 inhabitants in 2012, whereas the number of wells remained relatively stable in Plateau (4.2 wells per 10 000 inhabitants in 2006 and 5.2 per 10 000 inhabitants in 2012). Most of the wells drilled after 2006 were located in endemic foci for Buruli ulcer. In Ouémè, the increase in the number of wells was particularly large in the municipality of Bonou (from five wells per 10 000 inhabitants in 2006 to nine wells per 10 000 inhabitants in 2012) and Adjohoun (from four wells per 10 000 inhabitants in 2006 to 12 wells per 10 000 inhabitants in 2012), whereas the number of wells remained relatively stable (<1.5 times change) in the other three municipalities (Dangbo in Ouémè and Adja-Ouèrè and Pobè in Plateau; figure 3).

The increase in the number of new wells drilled and the decrease in the number of Buruli ulcer cases in Ouémè were strongly correlated in Bonou and Adjohoun (figure 3). By contrast, this correlation was almost non-existent when the number of wells drilled remained more stable. On the basis of this correlation, we hypothesise that the drilling of new wells provides the population with a source of protected water, thereby limiting contact with contaminated sources of water, favouring a decrease in the number of Buruli ulcer cases.

To investigate whether the drilling of new wells was a protective factor against Buruli ulcer, we did a case-control study in Bonou, which is the municipality with the highest level of endemicity for Buruli ulcer, and presented the strongest correlation between Buruli ulcer incidence and the number of wells drilled (figure 3, appendix p 3). Cases and controls were recruited from Sept 12, 2016, to Jan 20, 2017. Bonou consists of five districts (Damè-Wogon, Bonou, Atchonsa, Affamè, and Houtnigouè), each of which is crossed by the large Ouémè river (figure 4). The sociodemographic characteristics of the cohort are shown in the appendix (p 5). 470 patients living in Bonou were identified. Their areas of residence were distributed as follows: 153 (33%) were living in Atchonsa

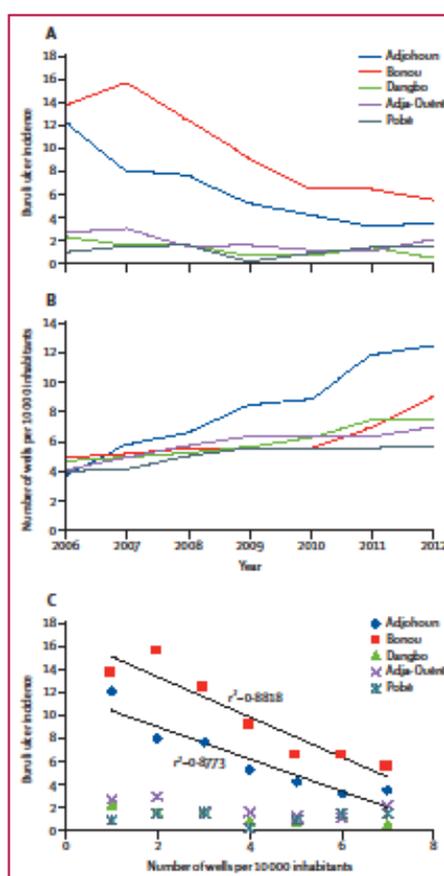
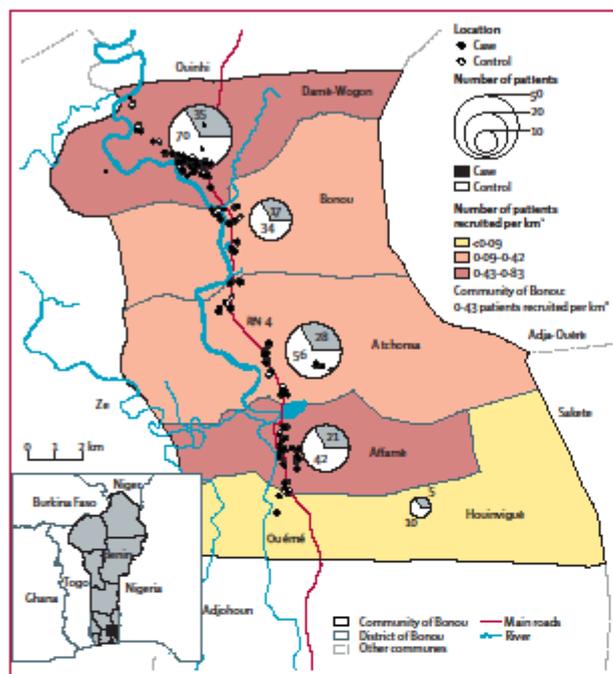


Figure 3: Correlation between decrease of Buruli ulcer incidence and increase of new wells in municipalities of Ouémè and Plateau

Incidence of Buruli ulcer in the municipalities of Ouémè (Bonou, Adjohoun, Dangbo) and Plateau (Pobè and Adja-Ouèrè) in which endemicity was highest (A). Only cases diagnosed (PCR-positive) by Centre for Leprosy and Buruli Ulcer Treatment and Diagnosis-Pobè from 2006 to 2012 are reported here. Number of wells per 10 000 inhabitants in the municipalities of Ouémè (Bonou, Adjohoun, Dangbo) and Plateau (Pobè and Adja-Ouèrè) with the highest levels of endemicity for 2006–12 (B). Linear correlation between Buruli ulcer incidence and the number of wells drilled, from 2006 to 2012, in the municipalities of Ouémè and Plateau with the highest endemicities (C). In Ouémè, the increase in the number of wells drilled was strongly correlated with the decrease in the number of Buruli ulcer cases, particularly in Bonou and Adjohoun. This correlation was very weak (almost non-existent) in the municipalities of Plateau and Ouémè in which the number of wells drilled remained more stable during the study period.

district, 110 (23%) in Damè-Wogon district, 93 (20%) in Affamè district, 90 (19%) in Bonou district and 24 (5%) in Houtnigouè district. The proportions of patients recruited from the various districts reflected the population densities of those districts. There was no exclusion



**Figure 4:** Map showing the number of patients recruited per 1000 inhabitants. Most of the patients recruited lived in Dambi-Wogon district (35 [33%] patients). The distribution of cases in the different districts over the 2006–15 period was proportional during recruitment. Only patients diagnosed (PCR-positive) by Centre for Leprosy and Buruli Ulcer Treatment and Diagnosis-Pobe are reported here.

criteria, but some patients refused to participate, were untraceable or moved out, or were deceased. We enrolled 106 individuals with previously diagnosed Buruli ulcer (diagnosed by the CDTLUB-Pobe) and 212 controls in this case-control study. Most patients (69 [65%] patients) were younger than 15 years old with a median age of 10 years (IQR 6–0–29–5). The sex ratio of male to female participants was 0.77 at the time of Buruli ulcer diagnosis. Most of the patients were young, accounting for the large proportion of schoolchildren and students among the recruited cases (49 [46%] patients). As ascertained from the questionnaire, the main socioeconomic activity in adult Buruli ulcer cases was subsistence farming (data not shown). We first did a univariate analysis to investigate the association between Buruli ulcer incidence and independent variables, such as sociodemographic factors and activities involving contact with water (table). Our analysis showed that regular contact with river water, and its use for washing, bathing, drinking, swimming, or cooking (OR 3.4, 95% CI 1.70–6.99;  $p=0.0013$ ) and being a schoolchild or student (OR 9.2, 95% CI 2.01–41.76;  $p=0.0041$ ) were associated with a higher risk of

contracting Buruli ulcer. These factors have been identified as the main risk factors in many epidemiological studies,<sup>19,22</sup> supporting the quality of our case-control study. Our analysis also clearly showed that the use of well water (for washing, bathing, drinking, or cooking) protected against Buruli ulcer (OR 0.2, 95% CI 0.06–0.55;  $p=0.0032$ ; table). We controlled for confounding factors by doing a multiple conditional logistic regression analysis including several variables known to be associated with Buruli ulcer (table). Variables identified in univariate analysis as of potential importance ( $p \leq 0.20$ ) were introduced into the logistic regression model. We found that regular use of river water (washing, bathing, drinking, swimming, or cooking) was strongly associated with the risk of contracting Buruli ulcer (adjusted OR 3.8, 95% CI 1.73–8.38;  $p=0.0011$ ; table). Regular use of well water for washing, bathing, drinking, or cooking reduced amounts of *M. ulcerans* infection (adjusted OR 0.1, 95% CI 0.04–0.44;  $p=0.0012$ ).

#### Discussion

As for other neglected tropical diseases, the fight against Buruli ulcer will require integrated approaches to reduce transmission and ensure earlier patient management.<sup>23</sup> Two major strategies can be used to reduce pathogen transmission. One strategy is mass vaccination of the exposed population to eradicate or eliminate the disease, as has already been done for various infectious diseases, including smallpox. However, this strategy has been unsuccessful for mycobacterial diseases (eg, the BCG vaccination and the elimination of tuberculosis). A second strategy is to use preventive approaches such as reducing contact between humans and the bacterium. This strategy has proved effective for various diseases, including cholera and various types of diarrhoea, but precise knowledge of the ecology and transmission routes of the causal microorganism is required.<sup>23–25</sup>

The beneficial effect of access to protected water sources has been established for several water-borne diseases (eg, typhoid and cholera), which are a major cause of morbidity and mortality worldwide. However, few studies have assessed the effect of well drilling on environmental microbial infections (caused by contact with, but not the ingestion of contaminated water, such as leptospirosis and Buruli ulcer). Previous epidemiological studies on Buruli ulcer in Benin reported case numbers at the national or regional level. However, Buruli ulcer has a highly focused distribution in endemic areas, with the coexistence of endemic and non-endemic subdistricts and districts within the same region.<sup>19</sup> At the scale of the municipality, we showed the existence of a strong correlation between the increase in the number of wells and the decrease in Buruli ulcer incidence, and we identified the use of well water as a factor clearly reducing the risk of *M. ulcerans* infection. This study provides the first evidence for a factor potentially accounting for the decrease in Buruli ulcer

	Cases (n=106)	Controls (n=212)	Univariate odds ratio (95% CI)	p value	Adjusted odds ratio (95% CI)	p value
<b>Professional activities</b>						
Informal workers	46 (43%)	109 (51%)	0.2 (0.05-0.59)	0.0063*	-	-
Not informal workers	60 (57%)	103 (49%)	1	-	-	-
Schoolchildren	49 (46%)	80 (38%)	9.2 (2.01-41.76)	0.0041*	8.8 (1.89-41.26)	0.0064*
Not schoolchildren	57 (54%)	132 (62%)	1	-	-	-
Formal workers	2 (2%)	2 (1%)	2.7 (0.23-33.00)	0.43	-	-
Not formal workers	104 (98%)	210 (99%)	1	-	-	-
<b>Washing, bathing, drinking, or cooking with well water</b>						
Yes	30 (28%)	81 (38%)	0.2 (0.06-0.55)	0.0032*	0.1 (0.04-0.44)	0.0012*
No	76 (72%)	131 (62%)	1	-	-	-
<b>Washing, bathing, drinking, or cooking with river water</b>						
Yes	87 (82%)	140 (66%)	3.4 (1.70-6.99)	0.0013*	3.8 (1.73-8.38)	0.0011*
No	19 (18%)	72 (34%)	1	-	-	-
<b>Frequency of river visits</b>						
Regular	54 (51%)	82 (39%)	2.2 (1.19-4.01)	0.012*	-	-
Occasional	52 (49%)	130 (61%)	1	-	-	-

Data are n (%) unless stated otherwise. The unadjusted odds ratio compared cases to the control group. The adjusted odds ratio adjusted for the effects of all variables included in the model. Officials are regular employees and workers refers to unreported employees having no contracts (eg, subsistence farming). \*Statistically significant.

**Table: Univariate analysis and conditional logistic regression of risk factors for Buruli ulcer in 318 people**

incidence. Our data suggest that the drilling of new wells could be crucial for decreasing the incidence of Buruli ulcer. However, the use of well water does not prevent the use of river water, and some types of behaviour or activity might persist and confer a high risk of developing Buruli ulcer. The identification of these types of behaviour and activities is essential to improve preventive strategies. Furthermore, to limit the incidence of Buruli ulcer in various endemic countries, it is crucial to identify the precise reservoirs and routes of transmission of the bacilli. In this respect, it has been proposed that humans are a main reservoir of the bacilli,<sup>26,27</sup> and that antibiotic treatment could break the epidemic cycle. However, the outbreak of Buruli ulcer in Australia since 2011 does not fully support such hypotheses because Australia is a country with a well developed health system, as well as the extinction of outbreaks before the introduction of antibiotics.<sup>28,29</sup> Epidemiological studies have identified aquatic environments as major areas of contamination.<sup>30,31</sup> Other factors could also be involved in the decrease of Buruli ulcer incidence in most endemic countries, such as changes in land use planning, including urban development and changes in agricultural practice. However, in the past 30 years, no noticeable or relevant improvements occurred in our study area, except for the improved access to drinking water. Such possible additional factors could be further investigated in larger scale studies grouping together several endemic sites and also resorting to relevant expertise in human and social sciences and geographical information systems.

One of the limitations of the study was the use of a retrospective case-control design with the associated possibility of bias. Nevertheless, the questionnaire was specifically designed to minimise such bias. Notably, the questionnaire required the participant to report in detail all behaviours connected to water activities. In rural areas of Benin, the activities connected to water are crucial for the household and repeated on a daily basis. In this context, it is expected that reports related to water activity are accurate. In addition, we did not include several confounding factors in the questionnaire, for which less trustworthy answers could have been expected (eg, duration of activities). A prospective case-control study that detailed all activities involving contact with water would improve our understanding as to which precise behaviours might be associated with a high risk of infection, further paving the way to the identification of contamination sites. However, with a small number of new cases per year, in a small area, implementation of such prospective studies is not expected in the immediate future.

Neglected tropical diseases affect more than 1 billion of the poorest people in the world,<sup>32</sup> populations who also often do not have ready access to protected water sources. This situation sustains a vicious cycle of poverty and disease, in a context in which it has already been established that access to protected water is crucial for the prevention and management of many neglected tropical diseases.<sup>33</sup> Our findings highlight the need to develop an integrated approach to fight Buruli ulcer within a One Health framework, to render patient management and disease prevention more efficient in exposed populations.

## Contributors

HD, EM, SF, and RCJ conceived and designed the experiments. HD, RG, and EM collected the data. HD, EM, and SG analysed the data. HD and EM wrote the first draft of the Article. SF, RCJ, and EY made a substantial intellectual contribution to the Article. All authors reviewed the manuscript and are in agreement with regard to the contents.

## Declaration of Interest

We declare no competing interests.

## Acknowledgments

We thank all the staff working at the Centre de Dépistage et de Traitement de la lèpre et de l'Ulcère de Buruli de Pôhè (The Pôhè Buruli Ulcer and Leprosy Screening and Treatment Centre). We thank all those at the Health Centers of Assoussa-Bonou, in particular Louïs Houmipain, who helped with data collection. We sincerely acknowledge Laurent Mansollier for their constructive and critical reviews.

## References

- Johnson PD, Sinear T, Small PL, et al. Buruli ulcer (*M. abscessus* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med* 2005; 2: e108.
- Brou T, Broun H, Elguero E, Assé H, Guigan JF. Landscape diversity related to Buruli ulcer disease in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e271.
- Marton E, Landler J, Botster P, et al. Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 551–53.
- Oluwasanmi JO, Solankos TF, Oluhin EO, Itayemi SO, Alabi GO, Lucas AO. *Mycobacterium abscessus* (Buruli) skin ulceration in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25: 122–28.
- Wansbrough-Jones M, Phillips R. Buruli ulcer: emerging from obscurity. *Lancet* 2006; 367: 1849–58.
- Atja H, Amano T, Cairncross S, Adomako J, Nanas OK, Coleman S. Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 387–92.
- Johnson PD, Vetch MC, Flood PE, Hayman JA. *Mycobacterium abscessus* infection on Phillip Island, Victoria. *Med J Aust* 1995; 162: 221–22.
- Marsden BJ, Djalilo MO, Horsburgh CR Jr, et al. Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 219–24.
- Nackers F, Johnson RC, Glynn JR, Zinsou C, Tongla R, Pomas F. Environmental and health-related risk factors for *Mycobacterium abscessus* disease (Buruli ulcer) in Benin. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 834–36.
- Poullou R, Matias G, Wondje CM, et al. Risk factors for buruli ulcer: a case-control study in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis* 2007; 1: e101.
- Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoah K, et al. Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium abscessus* infection): results from a case-control study in Ghana. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1445–53.
- Williamson HR, Most L, Donnell R, Aqqad M, Muerle RW, Small PL. *Mycobacterium abscessus* fails to infect through skin abrasions in a guinea pig infection model: implications for transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2770.
- Wagner T, Benbow ME, Brenden TO, Qi J, Johnson RC. Buruli ulcer disease prevalence in Benin, west Africa: associations with land use/cover and the identification of disease clusters. *In J Health Geogr* 2008; 7: 25.
- Wagner T, Benbow ME, Burns M, et al. A landscape-based model for predicting *Mycobacterium abscessus* infection (Buruli Ulcer disease) presence in Benin, west Africa. *Ecosyst Health* 2008; 5: 69–79.
- O'Brien DP, Joanne I, Blasdel K, Avumegah M, Achan E. The changing epidemiology worldwide of *Mycobacterium abscessus*. *Epidemiol Infect* 2018; 1–8.
- Vandellamoos K, Moshan CJ, Eddyant M, et al. Multiple introductions and recent spread of the emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* across Africa. *Genome Biol Evol* 2017; 9: 414–26.
- Vincom QB, Ardani MF, Adeyo A, et al. Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study. *Lancet Glob Health* 2014; 2: e222–30.
- Johnson RC, Makazaode M, Sogoh GE, et al. Buruli ulcer distribution in Benin. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 500–01.
- WHO. The EPI coverage survey. 2008. [https://www.who.int/immunization/documents/MLM\\_module?pdf?ua=1](https://www.who.int/immunization/documents/MLM_module?pdf?ua=1) [accessed Aug 2, 2019].
- Openshaw S. The modifiable areal unit problem. In: Concepts and techniques in modern geography. Norwich: Geo Books, 1983.
- Deville JC SC. Generalized raking procedure in survey sampling. *J Am Stat Assoc* 1993; 88: 8.
- Mtsho O, Marks M, Borran L, et al. Integrated control and management of neglected tropical skin diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11: e0005136.
- Bennett SD, Lowther SA, Chingoi F, et al. Assessments of water, sanitation and hygiene interventions in response to an outbreak of typhoid fever in Neno District, Malawi. *PLoS One* 2018; 13: e0193348.
- Cairncross S, Muller R, Zagaria N. Dracunculiasis (Guinea worm disease) and the eradication initiative. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 223–46.
- Davies HG, Bowman C, Luby SP. Cholera - management and prevention. *J Infect* 2017; 74 (suppl 1): S66–73.
- Roberson JA. What's next after 40 years of drinking water regulations? *Environ Sci Technol* 2011; 45: 154–60.
- Vandellamoos K, Phanzi DM, Kilubi K, et al. *Mycobacterium abscessus* population genomics to inform on the spread of buruli ulcer across central Africa. *mSphere* 2019; 4.
- Banbajens AH, Vandellamoos K, Moshan CJ, et al. Comparative genomics shows that *Mycobacterium abscessus* migration and expansion preceded the rise of buruli ulcer in southeastern Australia. *Appl Environ Microbiol* 2018; 84.
- Uganda Buruli Group. Epidemiology of *Mycobacterium abscessus* infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1971; 65: 763–75.
- Molynetz D. Neglected tropical diseases. *Current Eye Health* 2013; 26: 21–24.
- WHO. Water Sanitation and Hygiene for accelerating and sustaining progress on neglected Tropical Diseases (WASH), a global strategy 2012–2020. WHO, Geneva; 2015. [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/wash-and-ndd-strategy/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/wash-and-ndd-strategy/en/) [accessed Aug 2, 2019].

**Chapitre 5. A combined field study of Buruli ulcer disease in southeast Benin using epidemiological, geographical, behavioral and environmental analysis to propose preventative strategies**

**A combined field study of Buruli ulcer disease in southeast Benin using epidemiological, geographical, behavioral and environmental analysis to propose preventative strategies**

**H. Degnonvi<sup>1,3\*</sup>, A. Bocarro<sup>1,2\*</sup>, T. Brou<sup>4</sup>, M. Robbe-Saule<sup>1</sup>, L. Esnault<sup>1</sup>, Y. Boucaud<sup>1</sup>, M. Eveillard<sup>5</sup>, R. Gnimavo<sup>6</sup>, S. Hounsou<sup>3,7</sup>, A. Djenontin<sup>7</sup>, C. Johnson<sup>\*\*3</sup>, S. Fleuret<sup>\*\*2</sup>, E. Marion<sup>\*\*1</sup>**

<sup>1</sup> Univ Angers, Inserm, CRCINA, Angers, France

<sup>2</sup> Univ Angers, CNRS, ESO, Angers, France

<sup>3</sup> University Abomey Calavi, Cifred, Benin

<sup>4</sup> University La Reunion, Geography, France

<sup>5</sup> Univ Angers, Inserm, CHU Angers, CRCINA, Angers, France

<sup>6</sup> CDTLUB, Fondation Raoul Follereau, Pobè, Benin

<sup>7</sup> Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques, Benin

\*co-first authors

\*\*co-last authors

Corresponding author: [estelle.marion@inserm.fr](mailto:estelle.marion@inserm.fr)

All authors declare they have no actual or potential competing financial interest.

Dr Estelle Marion, Centre de recherche en cancérologie et immunologie Nantes-Angers, French National Institute of Health and Medical Research, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers 49000, France, 4 rue Larrey, 49033 Angers Cedex 01, France. Tel.: +33 2 41 35 34 72; fax: +33 2 41 35 41 64. E-mail address: [estelle.marion@inserm.fr](mailto:estelle.marion@inserm.fr)

**Cet article a été soumis dans la revue « Plos Global Public Health » le 15 Juillet 2021 et accepté en Novembre 2021 pour publication en ligne.**

## **RESUME**

### **Contexte**

L'ulcère de Buruli est une maladie tropicale négligée causée par *Mycobacterium ulcerans*, une mycobactérie environnementale. Cette maladie infectieuse cutanée touche les populations ayant un accès limité à l'assainissement, à l'eau salubre et aux soins vivant dans les zones rurales d'Afrique de l'Ouest et Centrale. Il n'y a pas de transmission d'homme à homme ; seules les eaux stagnantes à surface ouverte ou les eaux de ruissellement à débit lent ont été identifiées comme étant à risque en Afrique. Il est nécessaire d'élaborer des stratégies de prévention appropriées et efficaces pour les populations vivant dans des zones endémiques.

### **Objectifs**

Sur la base d'une approche multidisciplinaire dans une zone endémique de l'ulcère de Buruli située dans le Sud du Bénin, nous visons à comprendre toutes les interactions Homme-environnement liées à l'eau non protégée et les comportements associés, qui peuvent influencer les taux d'incidence afin de mettre en place de mesures préventives adaptées et rationalisées contre l'infection à *Mycobacterium ulcerans*.

### **Méthodes**

Plusieurs approches méthodologiques ont été utilisées dans notre étude à savoir : la définition et l'observation des lieux aquatiques, l'observation sur le terrain, l'étude cas-témoins, l'analyse spatiale et l'analyse d'échantillons environnementaux. Nous avons entrepris d'observer et de caractériser les différents points d'eau utilisés par les villageois en menant une étude cas-témoins prospective directement couplée avec des observations géographiques sur le terrain, l'analyse spatiale et la détection de *Mycobacterium ulcerans* dans l'environnement.

### **Résultats**

Les eaux de surface libres pour les activités domestiques ont été entièrement inventoriées dans un ensemble de 34 villages et les comportements humains les plus à risque de transmission ont été identifiés : (i) marche prolongée dans l'eau pour se rendre aux champs cultivés, (ii) collecte de l'eau, (iii) ou baignade. Les environnements les plus contaminés par *Mycobacterium. ulcerans* sont situés à plus de 67% dans les basfonds. Les orthoptères, hyménoptères, hétéroptères et autres invertébrés dont les mollusques, arachnides, décapodes et odonates sont les plus contaminés. La majorité des sites contaminés sont répartis sur les communes de Adjohoun, Bonou et Dangbo dans le département de l'Ouémé.

En combinant les résultats des différentes analyses, nous avons identifié que le facteur de risque le plus associé à l'apparition de l'ulcère de Buruli est la fréquence des contacts avec des sources d'eau naturelles et non protégées, surtout lorsque ces points d'eau sont situés dans des zones de bas-fonds régulièrement inondées ou irriguées.

Nous confirmons que l'utilisation d'eau propre provenant du forage confère une protection contre l'ulcère de Buruli.

### **Discussion**

Ces résultats précis et raffinés élargiront la portée pour concevoir une stratégie préventive appropriée, y compris certaines pratiques ou infrastructures observées au cours de nos enquêtes sur le terrain. Cela pourrait être amélioré par des connaissances supplémentaires sur les pratiques d'irrigation et les travaux agricoles dans les zones de bas-fonds.

**Mots clés :** Prévention primaire, ulcère de Buruli, santé publique environnementale

## ABSTRACT

**Background.** Buruli ulcer is a neglected tropical disease caused by *Mycobacterium ulcerans*, an environmental mycobacteria. This cutaneous infectious disease affects populations with weak access to sanitation, safe water and care living in rural areas of west and central Africa. There is no human-to-human transmission; only open surface stagnant waters or slow running waters have been identified at risk in Africa. There is a need for appropriate and efficient prevention strategies for populations living in endemic areas.

**Objectives.** Based on a multidisciplinary approach in a Buruli ulcer endemic area located in South of Benin, we aim to understand the link between all the human-environment interactions related to unprotected water and the associated behaviors, which may influence the incidence rates.

**Methods.** We set out to characterize the watering places that are used by villagers by conducting a prospective case-control study directly coupled with geographical field observations, spatial analysis, and the detection of *Mycobacterium ulcerans* in the environment.

**Results.** Free surface waters for domestic activities were fully inventoried in a set of 34 villages and human-behaviors at higher risk of transmission have been identified: (i) prolonged walking in the water to get to cultivated fields, (ii) collecting water, (iii) or swimming. A positivity rate of 27% of the 90 main sites surveyed was found. The environments most contaminated by *Mycobacterium ulcerans* are located at more than 67% in the lowlands. Orthopterans, Hymenoptera, Heteroptera and other invertebrates including molluscs, arachnids, decapods and odonates are the most contaminated. The majority of contaminated sites are located in the communes of Adjohoun, Bonou and Dangbo in the Ouémé department. A positivity rate of 27% of the 90 main sites surveyed was found. The environments most contaminated by *Mycobacterium ulcerans* are located at more than 67% in the lowlands. Orthopterans, Hymenoptera, Heteroptera and other invertebrates including molluscs, arachnids, decapods and odonates are the most contaminated. The majority of contaminated sites are located in the communes of Adjohoun, Bonou and Dangbo in the Ouémé department. By combining the results of the different analyses, we identified that the most associated risk for Buruli ulcer onset is the frequency of contacts with unprotected and natural water sources especially when these watering places are located in regularly flooded or irrigated lowlands. We confirm that the use of clean water from drilling confers a protection against Buruli ulcer.

**Discussion.** These specific and refined results will broaden the scope to design an appropriate preventive strategy including certain practices or infrastructure observed during our field investigations. This could be improved by additional knowledge on irrigation practices and agricultural work in low-lying areas.

## Introduction

Buruli ulcer is the third most common mycobacterial disease after tuberculosis and leprosy. This infection, caused by an environmental mycobacterium, *Mycobacterium ulcerans*, is characterised by extensive lesions of the skin and soft tissues, potentially resulting in scarring and serious functional disability (1). This neglected tropical disease may, in rare cases, be fatal, and has a major impact in terms of the stigmatisation, exclusion and poverty of those affected (proportion of disability: 25%). More than half of the new cases of Buruli ulcer reported are from countries along the Gulf of Guinea in West Africa: Benin, Cote d'Ivoire, Nigeria, Ghana, Sierra Leone, Togo, and Guinea (2). The cases are distributed in well demarcated geographical areas. The rural zones of West and Central Africa with little or no access neither to water treatment infrastructures nor to clean drinking water are the regions the most affected by this disease today (3-6). Endemic rural areas are also generally located near rivers and low-lying wet plains, floodable or irrigated, which can also be referred to with the generic term "lowlands" (7-10).

Buruli ulcer primarily affects children between the age of 5 and 15, representing around 50% of new cases in endemic African areas (11). In some epidemiological studies, women are more affected by the infection than men (12), but this varies from one country to another (13-15). Furthermore, there is no human to human transmission. In West Africa, the emergence and distribution of Buruli ulcer cases are clearly linked to aquatic ecosystems. Indeed, *M. ulcerans* is detected by qPCR in various elements of the aquatic food webs (9, 16-18). Based on ecological and epidemiological studies, different modes of transmission from aquatic environments have been suggested in Africa, including a passive or active trans-inoculation of *M. ulcerans* by plants or aquatic biting insects into the human skin (17, 19-22). Probably due to the mode of penetration of the bacillus into the body, the lesions are often localised on the lower limbs (60% of cases), and on the legs in particular (9). In this context, the principal risk factor for exposure to *M. ulcerans* identified to date in Africa is direct contact, of variable duration, with a slow-flowing or stagnant water source harbouring various aquatic organisms, probably leading to human contamination via bites, although this scenario does not exclude other possible modes of transmission (3, 10, 13, 23, 24).

Between the 1980s and 2006, the number of new cases of Buruli ulcer (between 5,000 and 10,000 cases per year according to the WHO) and the number of humid tropical regions affected increased continually (2, 9). However, over the last decade or so, we have observed a gradual, unexplained decrease in incidence in West and Central Africa and, conversely, an increase in

the number of cases in Australia (25). Early diagnosis combined with antibiotic treatment and appropriate wound care prevent permanent lesions such as amputations or disabling retractions of one or several limbs (26, 27). However, this management of patients is often difficult in the zones in which this disease is endemic and rife, particularly in the rural zones of West and Central Africa. It is, therefore, important to develop prevention strategies adapted to the lifestyles of the communities of villagers living in these zones. The formulation of an appropriate and effective prevention strategy requires the precise identification of (i) what makes an aquatic ecosystem favorable to *M. ulcerans*, and (ii) which behaviors and practices related to water are risk factors.

The districts of Ouémé and Plateau are among the most endemic for Buruli ulcer in Benin (3). Our research team has a long-standing partnership with the principal Buruli ulcer care centre, the CDTLUB in Pobé, which is the reference centre for Buruli ulcer management for these two districts (12, 18, 26, 28, and 29). With this partnership, we were able to report the variation in the incidence of Buruli ulcer between the Ouémé and Plateau districts (3). To understand the reasons for this variation, we set out to observe and characterize the watering places that are used by villagers by conducting a prospective case-control study directly coupled with geographical field observations, spatial analysis, and the detection of *M. ulcerans* in the environment. Our unique consortium combining several disciplines (medicine, epidemiology, microbiology, spatial analysis, and health geography) aims to reveal the main characteristics of the specific unprotected water sources used by local inhabitants in this region of Benin as well as risks and protective factors for *M. ulcerans* contamination. This study is drawn for identification of behaviors and territorial practices most linked to *M. ulcerans* and will highlight various modes of community management at a local village scale.

## **Materials and methods**

Several methodological approaches were used in our study: definition and observation of water places, field observation, case-control study, spatial analysis, and analysis of environmental samples.

### **1. Definition of water places**

Our field investigation used direct observation (30) in 34 villages to compile an exhaustive inventory and specific description of all water sources frequently visited by the population (Table 1, Fig. 1). Pictures and Global Positioning System (GPS) coordinates were recorded for 189 identified water sources. Another independent characteristic of these water points was their

localization in or not in a “lowland site”. Because of the proximity of Ouémé river and its tributaries, “lowland sites” were defined as humid and gentle slope areas (from 0 to 20 meters) where water is seasonally present depending on the river flooding and precipitation, but also areas flooded by overflowing watercourses that are found on higher lands. A water place never seasonally or intermittently flooded was defined as not inside a lowland site.

## **2. Field observation**

To identify human behaviors and activities related to water, 9 villages corresponding to 11 water sources of different types were thoroughly investigated over 3 months (Fig. 2A). The description of various individual behaviors is based on static observations (31, 32). The methodology was elaborated in four steps : (i) selection of the water sources in the village for long time observations; (ii) initial contact with the group studied on investigation site without collecting information, in order to be identified and accepted for the upcoming visits (the aim was to be able to observe without being noticed and thus without changing the usual behaviors); (iii) observation of all activities in and around water sources at different times of the day; (iv) quantitative data collection (age and gender, main activities and frequency of the visits) using a scoring grids, and qualitative data collection based on notes describing the general aspect of the water places, individual and collective behaviors related to aquatic environment. In total, 40 observation sessions were conducted (each session intended to last approximately three hours) and 1,411 different people were observed during their domestic and recreational activities related with water. Four age groups were defined to determine whether age and gender are linked to specific activities with water sources: 1. Children <15 years old, 2. Teenagers from 15 to 18, 3. Women and men from 19 to 50, and 4. Seniors >50 years old.

## **3- Case-control study**

### **3-1 Time frame and study design**

From January 2018 to December 2020, a 1:2 matched case-control study was conducted. Prospectively, epidemiological data were collected in all endemic communes of Ouémé and Plateau, covered by the CDTLUB-Pobè over the study period.

### **3-2 Participants**

Case: Buruli ulcer cases were defined on the basis of the WHO clinical definition, with a confirmation by PCR. Buruli ulcer cases for the case-control study were defined as any patient diagnosed with Buruli ulcer, treated at the CDTLUB-Pobè, and living in the district of Ouémé and Plateau at the time of diagnosis, between January 2018 and December 2020.

Controls: two controls among family members, friends, and neighbors matched by age ( $\pm 1$  year), sex, residence area, and profession, if possible, were enrolled.

Procedure for control recruitment: a door-to-door systematic procedure was implemented for control selection. For any given case, we took their house as a starting point; we then continued in a random direction. The random walking procedure described in our study was adapted from the methods detailed in a WHO survey (33) and is easy to implement during field investigations in rural areas. We then visited the nearest house and listed all members of the household to identify potential controls who fulfilled the matching criteria. If several suitable individuals were identified, we selected the closest person matching our criteria. The procedure was repeated until two suitable controls were identified. Controls were examined to rule out the possibility of an active or healed Buruli ulcer.

**3.3 Data collection:** a pre-tested questionnaire was read aloud to selected participants and completed in front of them. The questionnaire was written in French, and then translated into local languages when read aloud to participants. During the interviews, questions were asked to patients at the time of illness. The two controls were interviewed on their behavior at the same time. The questions included water contact and changes in behavior over time. The interviews were designed to identify the targeted periods and give benchmarks over time to minimize biases when doing the study.

**3.4 Variables:** the variables recorded in this study include: sociodemographic status (e.g., age, sex, education, region of residence, professional activities), life habits, water uses and activities involving contact with water (e.g., washing clothes, bathing, swimming, drinking, or cooking with river water or well water) and relation to disease (i.e. knowledge of cases about Buruli ulcer before they contracted the disease or knowledge of corresponding controls at the same periods, and special precautions based on hygiene, sanitation and other ancestral practices against Buruli ulcer).

### **3.5 Statistical analysis**

Data were processed and analyzed using XLSTAT version 2021.1.1 and Stata/SE version 11.0. Quality control was systematically done for all the data collected. Diagnosis of Buruli ulcer was considered as the dependent variable, and sociodemographic status (e.g., age, sex, education, region of residence, professional activities), life habits, water uses and activities involving contact with water (e.g., washing clothes, bathing, swimming, drinking, or cooking with river water or well water) and relation to disease were independent variables. The dependent variable

was dichotomized. Regarding the independent variables, a descriptive analysis was conducted. All variables were expressed as proportions.

Univariate analysis: for the purposes of univariate and multivariate analysis, independent variables with more than two categories (ethnic group, religion, main professional activities, domestic activities, hunting, fishing, and kitchen garden) were transformed into dichotomous variables.

Multivariate analysis: multivariable analysis was also conducted. The univariate odds ratios (ORs) and 95% CIs were estimated for each variable using a conditional logistic regression model (to account for the matched design) and significance was assessed with the Wald test. Interactions were tested by introducing interaction terms in the model. Variables with  $p < 0.20$  were entered into a multivariate conditional logistic regression model to simultaneously examine their independent effect. The final model was obtained through stepwise deletion of variables until all predictors left had  $p < 0.05$ .

### **3-6 Consent and ethical approval**

All participants included, or their parents or guardians (for minors aged less than 18 years), received information about the aims of the study. Given the high proportion of illiteracy among the rural inhabitants of the Ouémé and Plateau districts, oral informed consent was obtained from adults (cases and controls) or from the parents (or legal guardians) of minors (cases and controls), in the presence of the health worker (nurse) as a witness, before enrolment and interview. We also obtained authorization for data collection from the medical officers and heads of all the districts in the Ouémé and Plateau districts. Data collection was approved by the institutional review board of the CDTLUB and the national Beninese Buruli ulcer control authorities (IRB00006860), as well as the National Ethics Committee for Health Research (CNEERS) of Benin.

### **Spatial analysis**

The elevation data were taken from Landsat's 30-metre SRTM (Shuttle Radar Topography Mission). These data were particularly useful for highlighting the lowlands. Water surface data were extracted from Radar imagery. The possibilities offered by the European Space Agency (Copernicus) thanks to its Sentinel 1 sensors make it possible to have at least one image per month. On a Radar image, the water pixels are values below 0.05. A monthly time series of sentinel1 Radar images over the southern part of the Ouémé catchment area was set up over the year 2018 with 30 images. We were thus able to extract the water surfaces of the Ouémé basin

and reconstitute for each district the water surfaces per month during the year 2018. In addition, a distinction was made between permanent and seasonal surfaces. In addition to the radar images, we used optical sentinel 2 and Spot 6 images to map the seasonal vegetated water surfaces using SWI (Surface Water Index) and NDVI (Normalized Difference Vegetation Index). All the maps in this study were produced using ENVI and QGIS softwares. Principal Component Analysis (PCA) was run using XLSTAT.

## **Environmental study**

### **5-1 Sample collection**

Samples were collected from the principal and/or secondary unprotected sources of water for domestic uses of the participants belonging to the case-control study. The 92 sampling sites were spread throughout the Ouémé and Plateau municipalities. Aquatic sampling was carried out with the same methods at each site. Invertebrates and fish were captured with a square net from the surface down to a depth of 0.2 to 1 m, over a distance of 1 m. A sample was considered to correspond to all the insects collected in 10 such sweeps with the net. All insects were preserved in 70% ethanol for laboratory identification. For the detection of *M. ulcerans* DNA, the insects were sorted into pooled groups, each including no more than 20 specimens from the same family. For each body of water, we collected plant samples from the predominant and the second most frequent types of living plant. Each of these plant samples consisted of one to five plant leaves, stems, or roots, depending on the size of the plant sample. They were placed directly in a clean 100 mL bottle containing 70% ethanol.

### **5-2 DNA Extraction and Purification**

Samples were transferred to bead beating tubes (3 mm steel beads) containing 3 mL of PBS and were shaken with TissueLyser (Qiagen) for 10 min at 30 Hz. The samples were then transferred to a 50 mL tube and centrifuged at 420 x g for 1 min to remove host cell debris. The supernatant was transferred to another 50 mL tube and centrifuged at 4,600 x g for 30 min to pellet bacteria. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 750 µL of lysis buffer, transferred to bead beating tubes (ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, Zymo Research) and shaken with TissueLyser (Qiagen) for 10 min at 30 Hz to lyse the bacteria. DNA was extracted according to the manufacturer's protocol and eluted in 50 µL of RNase- and DNase-free water.

### **5-3 PCR.**

Oligonucleotide primer and TaqMan probe sequences were selected from the GenBank IS2404 sequences and the ketoreductase B (KR) domain of the mycolactone polyketide synthase (*mls*) gene from the plasmid pMUM001 (17). qPCR was performed in a reaction volume of 20  $\mu$ L containing qPCR mix, 300 nM primers, 100 nM TaqMan probe and 5  $\mu$ L of DNA or sterile water as negative control. Reactions were run on a AriaMx Thermocycler (Agilent), with the following program: 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Quantitative readout assays were set up, based on external standard curve with *M. ulcerans* DNA serially diluted over 6 logs. Samples were considered positive only if both the IS2404 sequence and the sequence encoding the KR domain of *mls* were detected, with threshold cycle (Ct) values strictly <36 cycles.

## **Results**

### **1. Field observation of water sources**

#### **1.1 Diversity of unprotected water sources used by local inhabitants**

All results presented in this manuscript come from an endemic region of southern Benin, including five municipalities located in the Ouémé and Plateau districts (Bonou, Adjohoun, Dangbo in Ouémé and Adja-Ouèrè and Pobè in Plateau). The Ouémé river crosses the three municipalities of the Ouémé district, while its tributaries are present in both districts (Fig. 1A). 210 villages (with varying incidence rates) are registered in this area, and epidemiological data on Buruli ulcer came from the main Buruli ulcer treatment centre in Benin (CDTLUB-Pobè). Based on our knowledge of this endemic area (3, 12, 28), we decided to conduct typology work in 34 villages distributed throughout the study area to reveal the diversity of unprotected and natural water sources used by local inhabitants (Table 1). Among the villages, seven are considered highly endemic (1 to 5 cases per year), 18 are considered endemic (0.2 to 1 cases per year), and nine lowly or not endemic (<0.2 per year). We identified 189 natural water sources used by local inhabitants of the 34 villages for various domestic activities related to water. Natural water sources can be divided into two groups: water bodies (n=30, 16%), including natural excavated areas (4%) and ponds or water holes (12%) of different shapes and sizes, and water courses (n=159, 84%), including the Ouémé river (7%), tributaries (21%), streams (24%), and springs (32%) (Fig. 1A-C, Table 1). Overall, 64% (n=121) of all water places observed were in lowlands.

The results of this first level of typology reveal that the local inhabitants of Ouémé use a greater diversity of unprotected natural water places than those living in Plateau because the

hydrological network is much more present (Fig. 1A, Table 1). Furthermore, the variables “rate of endemicity of villages” and “number of unprotected water sources” used by the local population were statistically associated ( $p < 0.001$ ). Indeed, the local population of the most endemic villages of Ouémé (from 1 to 5 cases per year) used an average of 9 different water places for their needs compared to 5 for lowly or not endemic villages. The nature of the water sources (water bodies or water courses) was not indicative of a greater risk of contamination. But the endemicity rates were associated with the location of a water site in lowlands (Table 1). On one side, there are lowlands with a shallow slope situated along or close to a large plain regularly flooded by the Ouémé river in spate. On the other side, there are low-lying lands that are more circumscribed in space and characterised by shorter periods of flooding due to the accumulation of runoff water or the backing up of a downstream river or stream. Almost 40% of villages investigated in Ouémé had more than half or all their water places in a lowland site versus 12% on the Plateau, which also had the lowest incidence rates.

## **1.2 Identification of human activities at water sources**

We thoroughly investigated 11 unprotected and natural water places to understand behaviors and territorial practices most linked to exposure to *M. ulcerans* (Fig. 2A-B). We listed 10 activities related to water (Fig. 2C), mainly done by female adults (45%), male adults (16%), and children aged 1-15 (13% female, 14% male) (Fig. 2D). The two most frequent activities were “crossing a water course” (40%) and “collecting water” (38%) (Fig. 2C). The activity “collecting water” corresponds to the collection and storage of water in plastic basins or buckets mainly done by adult females (60%) and female children (19%). During this activity, the time spent in the water does not exceed 5 minutes and feet and legs, but rarely upper body, are in contact with water. The activity “crossing a water course” corresponds to crossing a water site on the way to the fields or a neighboring village or crossing a flooded path or the bed of a stream for varying distances. Contact time with water depends on the nature of the water sites and the location of fields, with a high variability of water level between dry and flooded seasons. It is a repeated activity involving mainly female adults (39%).

The other eight activities represented around 22% of total activities. We observed recreational activity (4.5%) such as swimming mainly among young boys (71%). The young children (<3 years) waded in the water close to their mothers whereas older children tended to swim away from the main entrances with legs and upper limbs in the water. Many swimming places were observed away from the main water sources and were frequented by children without any adult supervision. Washing activities occurred at various times of the day. Laundry (5%) involved

the longest contact with aquatic environment (71 min on average). This activity takes place in the flow direction and at the cleanest access to water sources. Washing dishes was the rarest activity (0.30%) because it is a domestic activity done at home.

Principal component analysis (PCA) indicated a strong association between adult females and the activities “crossing a water course” and “collecting water”, but also with washing activities related to water in the broadest sense (Fig. 2E). Furthermore, the PCA showed a clear distinction between adult females and child males, the latter being specifically linked to swimming (recreational activity) and washing motorbikes.

These global results give us an idea of the type of activities and the type of contact between humans and unprotected water. There are of course some differences between the water sources evaluated in our area of study (suppl). Some of the 10 activities were not observed everywhere. For example, in Issaba village (not endemic), the activities carried out in the ponds are more strictly controlled (swimming, washing, or entering the water for fishing are prohibited) to preserve the water quality. Collecting water is mainly done by adult females while male children are involved in fishing, carried out on the banks of ponds but not directly in contact with the aquatic environment. Conversely, in Eguelou village (endemic), the activities related to water are carried out by a greater diversity of people (even if adult women are the main actors in the water supply) and mostly in direct contact with the water. Finally, certain village practices or infrastructures have been identified as protective against infection, although they were not initially put in place to protect from Buruli ulcer. Wooden bridges built by the local inhabitants in Illemon village (not endemic) make it possible to cross a watercourse without having contact with the aquatic ecosystems, while wooden boats and earthen dikes make it possible to move around the lowland site of Yokon village without systematically entering the water.

## **2. A prospective case-control study**

### **2.1 Description of the study population**

A total of 111 cases and 222 controls were enrolled in the study during the period 2018-2020. Participants lived in villages in the Ouémé (79.3%) and Plateau (20.7%) districts in Benin (Fig. 3A). Concerning cases, the median age at diagnosis was 15 years (IQR 9-36 years; mean 24 years), a large proportion of patients was schoolchildren and students (58 [52.3%] patients). The overall sex ratio of the patients was 0.61 at the time of Buruli ulcer diagnosis (69 [62.2%] women, 42 [37.8%] men,  $p = 0.02$ ). A distortion of the sex ratio was recorded as a function of

age, with females being widely predominant in patients > 15 years (women [71.7%], men [28.3%],  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3B).

## **2.2 Sociodemographic and professional characteristics of patients and controls**

Each patient was matched with two controls by age, sex, and location of the home to obtain a case-control ratio of 1:2. Ethnic group and main professional activities were similar between patients and controls (Table 2).

## **2.3 Analysis of general lifestyle characteristics**

According to the results of the univariate analysis, a number of people per household > 4 and always fetching water (Table 3) were statistically associated with the risk of contracting Buruli ulcer. Conversely, always cooking at home, washing dishes at home, make the home purchase, and use of drilling water were protective against Buruli ulcer (Table 3).

In our multivariate model (Table 4), the following risk factors were independently associated with Buruli ulcer: always being responsible for fetching water outside (OR= 3.4; 95% CI= 1.43–8.22) and households > 4 (OR= 1.2; 95% CI= 1.04–1.29). By contrast, washing the dishes at home (OR= 0.4; 95% CI= 0.15–0.97), make the home purchase (OR= 0.4; 95% CI= 0.13–0.90), and using drilling water (OR= 0.2; 95% CI= 0.08–0.44) were protective factors for Buruli ulcer (Table 4). We looked more closely at the variable “using the drilling water”. The control group used drilling water as the main water source more than the case group ( $p$ -value = 0.004, Fig. 3C). The case group, even if using drilling water as a main water source, more often used an unprotected water source (54%) as a second water source than the control group (30%) ( $p$ -value = 0.005, Fig. 3C).

## **2.4 Analysis of behavioral factors and water contact activities**

This analysis focused on behavioral factors and human activities associated with risk of *M. ulcerans* infection for cases ( $n= 88$ ) and controls ( $n=176$ ) living along the Ouémé river. We used the classification of water sources defined in our field observations to carry out analyses. According to the results of the univariate analysis, the use of water sources located in regularly flooded or irrigated lowland sites, collecting water outside several times per day, fetching water outside by entering water, washing outside several times per day, washing outside by entering water, swimming several times per day, swimming by entering water, washing or rinsing clothes outside several times per day, washing clothes outside alone, washing dishes several times per day, washing dishes by entering water, washing dishes alone, and fishing by entering water (Table 5) were statistically associated with the risk of contracting Buruli ulcer. On the

other hand, collecting water outside, wearing open shoes, knowledge about Buruli ulcer before infection or at the time of questionnaire filling for controls, sensitization on Buruli ulcer, and special precautions based on hygiene and sanitation and other ancestral practices were protective against Buruli ulcer (Table 5).

Multivariable analysis highlighted that the variable lowland site was at high risk of Buruli ulcer (Table 6). In our multivariate model, the following risk factors were independently associated with Buruli ulcer: main lowland water point (OR= 10.8; 95% CI= 1.09–107.59), fetching water outside weekly (OR = 3.9; 95% CI = 1.30-11.73), washing outside several times per day (OR = 10.4; 95% CI = 3.29-32.61), washing clothes alone (OR = 3.3; 95% CI = 1.28-8.48), washing the dishes occasionally (OR = 6.2; 95% CI = 1.43-27.23), and washing the dishes weekly (OR = 4.3; 95% CI = 1.03-18.21). By contrast, knowledge about Buruli ulcer (OR = 0.2; 95% CI = 0.07-0.39) was a protective factor.

### **3. Lowland as high-risk factor**

#### **3.1 Distance to a water area and number of Buruli ulcer cases**

We conducted a spatial analysis to further investigate the lowland variable identified at high risk of Buruli ulcer contamination. Thanks to the monthly radar images, we were able to distinguish a permanent water area corresponding to the Ouémé River and a seasonally open water area (in blue and yellow, respectively, in Fig. 3D). As the radar images could only detect open water surfaces, we additionally used optical images (sentinel 2 and spot 5) to highlight seasonally flooded areas covered by humid forest or vegetation (in pink in Fig. 3D). We then estimated the distance between patient location and water (permanent and/or seasonal). The number of Buruli ulcer cases increased with increasing proximity to a water area from 10 cases at 1200 m to 70 cases at less than 400 m (Fig. 3E). The increase was much more pronounced for semi-permanent or seasonal sites (from 0 cases at 1200 m to 53 cases at less than 400 m) than for the permanent surface waters corresponding to the Ouémé river (from 8 cases at 1200 m to 19 cases at less than 400 m) (Fig. 3E).

#### **3.2 Environmental tracking of *M. ulcerans* DNA**

During the case-control study, we sampled main and/or secondary natural water sources used by the participants. We looked for *M. ulcerans* DNA in aquatic animals and plants in 90 sampling sites. Environmental samples have been sorted and identified at the order and family levels. Among a total of 815 pools sorted by families, 55 were positive for *M. ulcerans* DNA detection (IS2404 and KR < 36ct and 2ct of difference) (Suppl Info S1). Concurrently, 24 sites

(27%) had at least one positive pool (Fig. 4A, 4B). It is noteworthy that 67% of positive sites were in a lowland site, while only 42% of negative sites were in a lowland site ( $p=0.025$ , Fig. 4B). Positive sites were mainly located at the border between wet and non-wetlands (Fig. 4A).

### 3.3 Water surface variation linked to endemicity

We additionally performed an analysis on monthly water surface during a year in each district of our study area (11 in the Plateau and 20 in the Ouémé). We ran a PCA with incidence and monthly water surface variables. Axis 1 (73% of the total variance) was positively correlated with all monthly water surface variables independently of the seasonality (Fig. 5A), representing the water surface which allows to distinguish the districts crossed by the Ouémé River and the dry districts located on the plateau (Fig. 5C). Interestingly, axis 2 (17% of the total variance) provided additional information (Fig. 5A, 5D): axis 2 was positively correlated with the wet months from July to November and negatively correlated with the other months. It allows to distinguish districts with low variation of water surface (Gangban, Fig. 5A, B and D) from those with high variation of water surface (Dame-Wogon, Fig. 5A, B and D). The major information is that the Buruli ulcer incidence is positively correlated with axis 2, meaning that districts with high seasonality of water surface are at higher risk. The districts with a high seasonality (Fig. 5D) had a number of new cases  $>1$  yearly (Fig 5E), while districts with no seasonality had low number of cases even if the Ouémé river crosses the district. This situation is illustrated by the contrast (Fig. 5B) between the Dame-Wogon district marked by a high seasonality of water surfaces (Fig. 5B) and a number of cases  $>5$  per year and Gangban marked by a regular and permanent surface over the year with a case number  $<1$  yearly (Fig. 5E).

## Discussion

Research has, to date, provided little information, at individual level, about the reasons for which one person becomes contaminated whereas another does not, or at communal level, concerning the modes of community management that could potentially protect (or not protect) against the disease. Most of the case-control studies were held in hospitals or health centers and few or no studies have been carried out in the living places of patients. These data collection methods contribute to imprecisions concerning interactions with local aquatic environments and real behaviour, and limit detailed epidemiological explorations. The limitations of this approach have been recorded in several studies conducted in West Africa (23, 34). We performed a combined analysis of epidemiological data, geographical and spatial data, and detection of *M. ulcerans* in the same period, providing new knowledge about risk and protective factors. To our knowledge, this is the first detailed study to use this multidisciplinary approach in a same period.

Our pilot study in health geography identified two activities (collecting water and crossing a water course) representing more than 80% of all activities observed with a predominance of adult females in charge of these activities. As it has been reported in a previous study (12), we identified a clear distortion of sex ratio in Buruli ulcer patients in this area, with more adult females infected by *M. ulcerans* than adult males. Therefore, we suspect that these activities are associated with greater risk of infection. The variable “collecting water” (for drinking, cooking, washing up or washing at home) is a risk factor recorded in our present prospective cohort and other case-control studies published in the second half of the 2000s in Benin (34, 35). The important role of women in this activity is also supported by data from our field observations and other social science studies (36, 37). However, the risk of contamination can be considered low when the water sources frequented are characterized by circulating water, regular maintenance of the surrounding areas, and occasionally protective layouts (38).

The activity “crossing a water course” on foot to reach cultivated fields or a neighbouring village is a risk factor recorded in more recent case-control studies, particularly in Ghana and Togo (10, 13, 24), likely because it is a practice that requires staying for a long time to be able to observe it. This activity causes prolonged contact with water and related elements promoting contact with *M. ulcerans* through aquatic plants or fauna, especially during the rainy season. Prolonged walking in the water was most frequently observed in the perimeter of lowlands. Published studies have shown that the extent of lesions is significantly correlated with unclothed body parts (9). More than 60% of the lesions are found on the lower parts of the body

(mainly the legs). We saw young children remove most of their clothes before crossing, and adult females roll up the bottom of the garment exposing the lower body.

During field observations, the activity “swimming” was rarely practiced compared to “collecting water” and “crossing a water course” but we also suspect this practice and the behaviors associated with it as risk factors of contamination. Children less than 15 years of age represent more than 50% of Buruli ulcer patients. Some studies indicated that there is no sex ratio differences in the distribution of cases among children (23) but others reported that the prevalence in young boys is higher than girls (12, 35). From our field observations, swimming or wading in rivers is the only activity that involves only children and more particularly boys, who do not have protective clothing, especially in stagnant water during the rainy season, which increases the risk of exposure.

A key strength of our case-control study is the recruitment of incident cases, allowing detailed assessment of exposures in a well-defined period, during the six months prior to onset of symptoms. Case-control studies offer a better design but still information and selection bias may happen. Regarding information bias, questionnaires in this study were administered at the time patients were diagnosed. All controls were made comparable to the cases based on several criteria (individual matching). The matching was to make the cases and controls identical or similar for potential confounding factors. The limits of this type of study would lie in the choice of the control group and the quality of exposure measurement. However, the adjustment for confounding factors and multivariate analysis made allow us to minimize the biases as much as possible. In addition, the results of this case-control study converge with the results of the socio-environmental data reported in this work, which confirm our results.

In a previous study, we showed a correlation between the increase in the number of new wells and the decrease in the incidence of Buruli ulcer in some endemic villages in Northern Ouémé (3). In our prospective case-control study, we find at a larger scale that the use of protective water points (drilling water, wells) is reported more frequently in controls than in cases. We also found that being solely responsible for fetching water outside and large households were independently associated with Buruli ulcer incidence. We could explain the relationship between the increase in the number of people per household and the incidence by the fact that large households require more water and therefore have greater risk of coming into contact with unprotected water points. We observed that it is not just the contact with the unprotected and natural water sources that is most associated with risk but the frequency and especially going

there alone several times per day, particularly when these resources are located in regularly flooded or irrigated lowlands.

In parallel, a high prevalence of Buruli ulcer was recorded in the villages near a lowland site. *M. ulcerans* was more often detected in aquatic organisms coming from the floodplain of the Ouémé River than the water sources in uplands. Thanks to radar images, we highlight that temporary submersion of land surface by flood and runoff waters is more directly linked to Buruli ulcer incidence than permanent water surfaces. In these districts, the surface and water levels of the aquatic areas change considerably from one season to another. These results support our previous scenarios that *M. ulcerans*, once introduced into a new environment, expands instead of becoming a quiescent pathogen (39). It also suggests that *M. ulcerans* can be introduced in temporary or semi-permanent water sites and then disappears, as it is the case in endemic villages located in Plateau.

To plan a preventative strategy in the study area, the first point is to identify in each village the specific unprotected water sources representing a risk for *M. ulcerans* contamination. A potential transmission site follows at least one of the following criteria: (i) stagnant surface water or slow-flowing watercourses, (ii) and a seasonally flooded site after the rainy season. Permanent water sources outside a lowland site and water sources characterized by a circulating water or a regular maintenance of the surrounding areas are not considered as risk places. In the selected water sites, the target population for prevention corresponds to children and adults using these water sources. A simple and clear message of prevention could be presented as follows: (i) use water from drilling for all domestic needs, (ii) do not have contact with water from unprotected and natural water sources especially when flooded, and (iii) avoid crossing or walking along water without protective clothing and particularly over long distances. At the scale of the village or community, prevention can be established around these results: (i) provide access to drilling water throughout the year, (ii) build bridges and earthen levees out of water or value inland waterway craft to limit walking in water during the wet season, and (iii) promote the use of free surface waters for domestic activities localized outside lowland sites. Our results have also demonstrated the benefits of changing approach and reasoning not according to instantaneous implantations, but on the basis of living spaces containing both “safe” points of access to water and other points of access to water at which humans may be exposed to the *M. ulcerans* bacterium. These points of access can have potentially risky semi-permanent or seasonal wetlands visited for reasons other than the collection of water. Behaviours and territorial practices in the lowland areas are far from limited to domestic

activities. As a means of diversifying their income and supplying the markets of the towns and their surrounding areas with fresh produce, the villagers have developed rice and maize production and market gardening activities (40). Since the 1980s, runoff and irrigation networks have been traced out, to improve the use of the damp and fertile low-lying areas. One possible consequence of these hydroagricultural developments is the modification of natural habitats favouring the development of *M. ulcerans*, certain vectors, or certain ecological reservoirs. These hypotheses are also supported by other studies performed in Benin (41, 42) highlighting a progressive decrease in incidence with the development and clearing of the low-lying areas and improvements in water management techniques. From our prospective cohort study, we detected the presence of *M. ulcerans* in aquatic organisms collected in fields flooded during a part of the year and frequented by some patients for agricultural work.

To our knowledge, no social science studies have explored the question of agricultural behavior and territorial practices in lowlands to design an adequate preventative strategy. We still know little about these hydro-agricultural practices in the low-lying areas, which were shown to be associated with risk factors for exposure in recent case-control studies (9, 13, 20, 43) and they have not been analysed in a systematic manner. However, some information on agricultural work (soil preparation, planting, maintenance, and harvesting) indicate that the work is still mainly done manually (41) and involves frequent contact with water. According to INSAE (National Institute of Statistics and Economic Analysis) data, adult females provide between 60% to 80% of the agricultural labor force in the rural areas. However, the organization of labor tasks between all family members is not well documented and the role of women and children is underestimated (44). The observation and characterization of hydro-agricultural practices in the low-lying areas and organization of labour represent a challenge to define appropriate and effective preventive measures and to reduce the incidence of infectious diseases related to water.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Région Pays de la Loire (Grant GEANT), Fondation Raoul Follereau, and Inserm. We would like to thank Life Science Editors for editing services. We would like to thank the ESA (European Spatial Agency) for free access to the Sentinel 1&2 datas and the THEIA project supported by the CNES for providing Spot 6 images. We thank the « Services de la Direction de l'Information sur l'eau » from the Ministry of Water at Cotonou, Bénin to share the spatial water datasets of Ouémé and Plateau Districts. We would

like to send our sincere thanks to Bello Adéyèmi, motorcycle driver and translator in this field observation study.

## References :

1. Johnson PD, Stinear T, Small PL, Pluschke G, Merritt RW, Portaels F, et al. Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med.* 2005;2(4):e108.
2. Simpson H, Deribe K, Tabah EN, Peters A, Maman I, Frimpong M, et al. Mapping the global distribution of Buruli ulcer: a systematic review with evidence consensus. *Lancet Glob Health.* 2019;7(7):e912-e22.
3. Degnonvi H, Fleuret S, Coudereau C, Gnimavo R, Giffon S, Yeramian E, et al. Effect of well drilling on Buruli ulcer incidence in Benin: a case-control, quantitative survey. *Lancet Planet Health.* 2019;3(8):e349-e56.
4. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, Le Gall P, et al. Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(3):551-3.
5. Barker DJ. The distribution of Buruli disease in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972;66(6):867-74.
6. Chukwuekezie O, Ampadu E, Sopoh G, Dossou A, Tiendrebeogo A, Sadiq L, et al. Buruli ulcer, Nigeria. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):782-3.
7. Kenu E, Ganu V, Calys-Tagoe BN, Yiran GA, Lartey M, Adanu R. Application of geographical information system (GIS) technology in the control of Buruli ulcer in Ghana. *BMC Public Health.* 2014;14:724.
8. Brou T, Broutin H, Elguero E, Asse H, Guegan JF. Landscape diversity related to Buruli ulcer disease in Cote d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(7):e271.
9. Zingue D, Bouam A, Tian RBD, Drancourt M. Buruli Ulcer, a Prototype for Ecosystem-Related Infection, Caused by *Mycobacterium ulcerans*. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(1).
10. Aboagye SY, Asare P, Otchere ID, Koka E, Mensah GE, Yirenya-Tawiah D, et al. Environmental and Behavioral Drivers of Buruli Ulcer Disease in Selected Communities Along the Densu River Basin of Ghana: A Case-Control Study. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(5):1076-83.
11. Yotsu RR, Murase C, Sugawara M, Suzuki K, Nakanaga K, Ishii N, et al. Revisiting Buruli ulcer. *J Dermatol.* 2015;42(11):1033-41.
12. Vincent QB, Ardant MF, Adeye A, Goundote A, Saint-Andre JP, Cottin J, et al. Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study. *Lancet Glob Health.* 2014;2(7):e422-30.

13. Kenu E, Nyarko KM, Seefeld L, Ganu V, Kaser M, Lartey M, et al. Risk factors for buruli ulcer in Ghana-a case control study in the Suhum-Krabo-Coaltar and Akuapem South Districts of the eastern region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11):e3279.
14. Landier J, Boisier P, Fotso Piam F, Noumen-Djeunga B, Sime J, Wantong FG, et al. Adequate wound care and use of bed nets as protective factors against Buruli Ulcer: results from a case control study in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):e1392.
15. Nackers F, Dramaix M, Johnson RC, Zinsou C, Robert A, E DEBB, et al. BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer: a case-control study in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(4):768-74.
16. Marion E, Chauty A, Yeramian E, Babonneau J, Kempf M, Marsollier L. A case of guilt by association: Water bug bite incriminated in *M. ulcerans* infection. *Int J Mycobacteriol*. 2014;3(2):158-61.
17. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, Aubry J, et al. Seasonal and regional dynamics of *M. ulcerans* transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):e731.
18. Zogo B, Djenontin A, Carolan K, Babonneau J, Guegan JF, Eyangoh S, et al. A Field Study in Benin to Investigate the Role of Mosquitoes and Other Flying Insects in the Ecology of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003941.
19. Wallace JR, Mangas KM, Porter JL, Marcsisin R, Pidot SJ, Howden B, et al. *Mycobacterium ulcerans* low infectious dose and mechanical transmission support insect bites and puncturing injuries in the spread of Buruli ulcer. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):e0005553.
20. Williamson HR, Benbow ME, Campbell LP, Johnson CR, Sopoh G, Barogui Y, et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in the environment predicts prevalence of Buruli ulcer in Benin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1):e1506.
21. Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, Andre JP, Small PL, Milon G, et al. Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. *Cell Microbiol*. 2005;7(7):935-43.
22. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(9):4623-8.

23. Aiga H, Amano T, Cairncross S, Adomako J, Nanas OK, Coleman S. Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(4):387-92.
24. Maman I, Tchacondo T, Kere AB, Piten E, Beissner M, Kobara Y, et al. Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli Ulcer) in Togo horizontal line a case-control study in Zio and Yoto districts of the maritime region. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):48.
25. O'Brien DP, Jeanne I, Blasdel K, Avumegah M, Athan E. The changing epidemiology worldwide of *Mycobacterium ulcerans*. *Epidemiol Infect.* 2018:1-8.
26. Phillips RO, Robert J, Abass KM, Thompson W, Sarfo FS, Wilson T, et al. Rifampicin and clarithromycin (extended release) versus rifampicin and streptomycin for limited Buruli ulcer lesions: a randomised, open-label, non-inferiority phase 3 trial. *Lancet.* 2020;395(10232):1259-67.
27. Tanywe A, Fernandez RS. Effectiveness of rifampicin-streptomycin for treatment of Buruli ulcer: a systematic review. *JBIC Database System Rev Implement Rep.* 2017;15(1):119-39.
28. Marion E, Ganlonon L, Claco E, Blanchard S, Kempf M, Adeye A, et al. Establishment of quantitative PCR (qPCR) and culture laboratory facilities in a field hospital in Benin: 1-year results. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4398-400.
29. Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, Marot A, Wondje CM, Saint-Andre JP, et al. Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. *PLoS Med.* 2007;4(2):e64.
30. A.M. A, P. F. L'observation directe: Armand Collin; 2015. 128 p.
31. Arborio AM. L'observation directe en sociologie : quelques réflexions méthodologiques à propos de travaux de recherches sur le terrain hospitalier. *Recherche en soins infirmiers.* 2007;90:26-34.
32. Chapoulie JM. Le travail de terrain, l'observation des actions et des interactions, et la sociologie. *Sociétés contemporaines.* 2000;40:5-27.
33. WHO. The EPI coverage survey 2008 [Available from: [https://www.who.int/immunization/documents/MLM\\_module7.pdf?ua=1](https://www.who.int/immunization/documents/MLM_module7.pdf?ua=1)]
34. Nackers F, Johnson RC, Glynn JR, Zinsou C, Tonglet R, Portaels F. Environmental and health-related risk factors for *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in Benin. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(5):834-6.

35. Debacker M, Portaels F, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers W, et al. Risk factors for Buruli ulcer, Benin. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(9):1325-31.
36. Baron C, Tidjana Alou M. L'accès à l'eau en Afrique subsaharienne : au-delà des modèles, une pluralité d'innovations locales. *Mondes en développement.* 2011;3/155:7-22.
37. Hounmenou GG. Gouvernance de l'eau potable et dynamique locales en zone rurale au Bénin. *Développement durable et territoires, Economie, géographie, politique, droit, sociologie.* 2006;6(les territoires de l'eau).
38. Boccarossa A, Fleuret S. Observer et comparer les points d'eau fréquentés en milieu villageois : vers une meilleure compréhension des mécanismes de transmission de la maladie de l'ulcère de Buruli au sud-est du Bénin. *Revue francophone sur la santé et les territoires.* 2020.
39. Coudereau C, Besnard A, Robbe-Saule M, Bris C, Kempf M, Johnson RC, et al. Stable and Local Reservoirs of *Mycobacterium ulcerans* Inferred from the Nonrandom Distribution of Bacterial Genotypes, Benin. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(3):491-503.
40. Iwikotan A. Exploitation des bas-fonds : un enjeu important pour le développement socio-économique du Bénin. *Annales de la Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines, Université d'Abomey-Calavi.* 2016;3(22).
41. Abou M. Caractérisation des systèmes de production sur les sites d'aménagements hydro-agricoles dans le doublet Dangbo-Adjohoun au sud du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences.* 2018;12(1):462-78.
42. Hounsou BM. Incidence socio-économiques et sanitaires de la mise en valeur durable des bas-fonds de la commune de Zagnanado (département du Zou, Bénin). *International Journal of Biological and Chemical Sciences.* 2020;15(5):1786-99.
43. Sopoh GE, Johnson RC, Anagonou SY, Barogui YT, Dossou AD, Houezo JG, et al. Buruli ulcer prevalence and altitude, Benin. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):153-4.
44. Iwikotan A. Impact de l'exploitation des bas-fonds dans l'amélioration des conditions de vie des femmes du centre du Bénin. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin* 2011;1(Exploitation et aménagement des bas-fonds du centre du Bénin):35-46.

**Table 1: Types of water sources and Buruli ulcer incidence in 34 surveyed villages of Plateau and Ouémé districts**

Villages	District	Incidence rate		Number of unprotected water sources	Number of water sources in a lowland (%)	River Ouémé	Tributary	Stream	Spring	Natural excavated area	Pond and water hole
Illemon	Plateau	0		5	0		5				
Obeke-Ouere	Ouémé	0,03		1	0			1			
Illoulofin	Plateau	0,05		6	0		3	1	1	1	
Ketty	Plateau	0,07		3	0		1	1			1
Kpanoukpade	Ouémé	0,07		1	1 (100%)					1	
Trobossi	Ouémé	0,13		4	0		1	2	1		
Kpoulou	Ouémé	0,15		4	2 (50%)		1			3	
Itchede	Plateau	0,19		3	0						3
Houezonme-Kpevi	Ouémé	0,19		2	2(100%)					2	
Fingninkanme	Ouémé	0,2		1	0				1		
Itchoche	Plateau	0,22		1	0						1
Issaba	Plateau	0,29		10	0			2			8
Onigbolo	Plateau	0,29		3	0		1		1		1
Houedame	Ouémé	0,42		8	0			1	7		
Zoungue	Ouémé	0,43		10	10 (100%)			3	6		1
Wovime	Ouémé	0,45		2	1 (50%)	1				1	
Ouebossou	Ouémé	0,49		12	4 (25%)	6	1		3		2
Towi	Ouémé	0,5		7	0			4	3		
Zoukou	Ouémé	0,54		1	1 (100%)				1		
Deme	Ouémé	0,57		6	0	6					
Mitro	Ouémé	0,64		3	3 (100%)			3			
Sota	Ouémé	0,65		3	3 (100%)				2		1
Agbosso	Ouémé	0,66		1	1 (100%)				1		
Yokon	Ouémé	0,83		9	9 (100%)			4	5		
Gbekandji I	Ouémé	0,88		1	1 (100%)					1	
Agbonan	Ouémé	0,98		16	1 (6%)		2	9	4		1
Eguelou	Plateau	0,98		4	2 (50%)		2			1	1
Affame Centre	Ouémé	1,11		2	1 (50%)				2		
Sissekpa	Ouémé	1,68		18	11 (60%)		4	2	12		
Agbomahan	Ouémé	1,7		19	1 (5%)		2	9	8		
Houeda	Ouémé	2,24		7	7 (100%)			6	1		
Dasso	Ouémé	2,36		3	3 (100%)				3		
Tode	Ouémé	2,47		4	4 (100%)				4		
Olohoubodje	Ouémé	4,07		9	4 (44%)		5	4			

**Table 2: Socio-demographic, professional, and clinical characteristics of BU cases and controls sex and  $\pm$  1 year age-matched, Benin, 2018-20**

Characteristic	Cases (%) (n=111)	Controls (%) (n=222)	Univariate OR	95% CI	P value
<b>Demographic</b>					
<b>SEX</b>					
M	42 (37.8)	84 (37.8)	NA	-	NA
F	69 (62.2)	138 (62.2)	NA	-	NA
<b>Age</b>					
$\leq 15$	58 (52.3)	113 (50.9)	NA	-	NA
$> 15$	53 (47.7)	109 (49.1)	NA	-	NA
<b>Ethnic group fon</b>	10 (9.1)	30 (13.5)	0.56	0.24 – 1.32	0.186
<b>Ethnic group goun</b>	81 (72.9)	158 (71.2)	1.19	0.59 – 2.40	0.638
<b>Ethnic group holi</b>	14 (12.6)	26 (11.7)	1.3	0.38 – 4.45	0.671
<b>Ethnic group nago</b>	6 (5.4)	8 (3.6)	1 (reference)	-	-
<b>Religions</b>					
Catholic	29 (26.2)	83 (37.4)	0.5	0.25 – 0.87	0.017
Heavenly	26 (23.4)	34 (15.3)	1.8	0.97 – 3.27	0.061
Evangelical	47 (42.3)	81 (36.5)	1.4	0.81 – 2.26	0.255
Muslim	3 (2.7)	10 (4.5)	0.6	0.14 – 2.19	0.399
Traditional	6 (5.4)	13 (5.9)	0.9	0.26 – 2.96	0.838
Nothing	0 (0)	1 (0.5)	1 (reference)	-	-
<b>Main Professional activities</b>					
Craftsman	21 (18.9)	36 (16.2)	1.3	0.64 - 2.63	0.468
Farmer	13 (11.7)	22 (9.9)	1.5	0.50 - 4.48	0.467
Trader	20 (18.0)	39 (17.6)	1.1	0.51 – 2.13	0.903
Schoolboy	49 (44.1)	101 (45.5)	0.8	0.37 – 1.91	0.672
Official	1 (0.9)	4 (1.8)	0.4	0.04 – 4.61	0.489
Nothing	7 (6.3)	20 (9.01)	1 (reference)	-	-
<b>Clinical forms of onset of BU (patient statement)</b>					
Nodule	60(54.1)	-	-	44.8 – 63.3	-
Oedema	49 (44.1)	-	-	34.9 – 53.4	-
Plaque	2 (1.8)	-	-	0.0 – 4.3	-

**Note:** Data are no. (%) of participants. OR, unadjusted odds ratio comparing cases to the two controls; CI, confidence interval. NA= non applicable because of matching.

**Table 3: Univariate analysis of selected variables for general lifestyle characteristics of the cohort, Benin, 2018-20**

Characteristics	Cases (%) (n=111)	Controls (%) (n=222)	Univariate OR	95% CI	P value
<b>Number of people/households: ≤ 4 vs &gt; 4</b>	37 (33.3)	90 (40.5)	1.1	1.02 – 1.23	0.020
<b>Domestic Activities in charge</b>					
<b>Cooking</b>					
Never	49 (44.1)	98 (44.1)	1 (reference)	-	-
Sometimes	34 (30.6)	51 (22.9)	1.6	0.92 – 2.88	0.098
Always	28 (25.2)	73 (32.9)	0.49	0.25 – 0.99	0.048
<b>Washing dishes at home</b>					
Never	35 (31.5)	70 (31.5)	1 (reference)	-	-
Sometimes	46 (41.4)	66 (29.7)	1.9	1.10 – 3.15	0.021
Always	30 (27.1)	86 (38.7)	0.42	0.22 – 0.80	0.008
<b>Washing clothes at home</b>					
Never	33 (29.7)	57(25.7)	1 (reference)	-	-
Sometimes	24 (21.6)	52 (23.4)	0.9	0.47 – 1.64	0.673
Always	54 (48.7)	113 (50.9)	0.9	0.47 – 1.56	0.606
<b>Cleaning the house</b>					
Never	33 (29.7)	59 (26.6)	1 (reference)	-	-
Sometimes	31 (27.9)	66 (29.7)	0.9	0.50 - 1.59	0.698
Always	47 (42.4)	97 (43.7)	0.9	0.51 – 1.64	0.766
<b>Fetching the water</b>					
Never	33 (29.7)	87 (39.2)	1 (reference)	-	-
Sometimes	25 (22.5)	50 (22.5)	1	0.55 – 1.81	1
Always	53 (47.8)	85 (38.3)	1.8	1.01 – 3.13	0.047
<b>Washing the motorcycles/vehicles</b>					
Never	101 (90.9)	197 (88.7)	1 (reference)	-	-
Sometimes	6 (5.4)	19 (8.6)	0.6	0.22 – 1.56	0.285
Always	4 (3.6)	6 (2.7)	1.4	0.34 – 6.11	0.619
<b>Make the home purchase</b>					
Never	54 (48.6)	106 (47.7)	1 (reference)	-	-
Sometimes	31 (27.9)	45 (20.3)	1.6	0.90 – 2.69	0.110
Always	26 (23.5)	71 (32)	0.5	0.25 – 0.96	0.039
<b>Hunting</b>					
Never	94 (84.7)	195 (87.8)	1 (reference)	-	-
Sometimes	16 (14.4)	24 (10.8)	2	0.7 – 5.6	0.188
Always	1 (0.9)	3 (1.4)	0.7	0.07 – 6.41	0.725
<b>Fishing</b>					
Never	86 (77.5)	187 (84.2)	1 (reference)	-	-
Sometimes	18 (16.2)	29 (13.1)	1.6	0.66 – 3.66	0.315
Always	7 (6.3)	6 (2.7)	3.4	0.83-13.56	0.088
<b>Kitchen Garden</b>					
Never	86 (77.5)	174 (78.4)	1 (reference)	-	-
Sometimes	18 (16.2)	40 (18.1)	0.9	0.46 – 1.65	0.666
Always	7 (6.3)	8 (3.5)	2.1	0.63 – 6.81	0.229
<b>Water contact activities</b>					
<b>Use of Drilling water</b>					
Yes	50 (45.1)	137 (61.7)	0.20	0.09 – 0.44	0.000
No	61 (54.9)	85 (38.3)	1 (reference)	-	-

**Note:** Data are no. (%) of participants. OR, unadjusted odds ratio comparing cases to the two controls; CI, confidence interval. NA= non applicable because of matching.

**Table 4: Multivariate analysis showing general lifestyle factors of the cohort independently associated with Buruli ulcer, Benin, 2018-2020**

<b>Variables</b>	<b>Adjusted OR (95% CI)</b>	<b>p-value</b>
<b>Washing dishes at home</b>		
Never	1 (reference)	
Sometimes	1.1 (0.55 – 2.34)	0.739
Always	0.4 (0.15 – 0.97)	0.042
<b>Make the home purchase</b>		
Never	1 (reference)	
Sometimes	0.9 (0.44 – 1.89)	0.798
Always	0.4 (0.13 – 0.90)	0.030
<b>Fetching the water outside</b>		
Never	1 (reference)	
Sometimes	1.6 (0.70 – 3.50)	0.273
Always	3.4 (1.43 – 8.22)	0.006
<b>Drilling water</b>	0.2 (0.08 – 0.44)	0.000
<b>Number of people per household</b>	1.2 (1.04 – 1.29)	0.008

**Note:** OR, unadjusted odds ratio comparing cases to the two controls; CI, confidence interval

**Table 5: Univariate analysis of the water contact activities of BU cases and controls sex and ± 1 year age-matched living along the river, Ouémé, Benin, 2018-20**

Characteristics	Cases (%) (n=88)	Controls (%) (n=176)	Univariate OR	95% CI	P value
<b>Main water point</b>					
Lowland	15 (17.0)	16 (9.1)	13.7	1.70 – 110.09	0.014
No Lowland	73 (83)	160 (90.9)	-	-	
<b>River water</b>					
Yes	24 (27.3)	32 (18.2)	14.7	1.86 – 117.09	0.011
No	64 (72.7)	144 (81.8)	1 (reference)	-	-
<b>Stream</b>					
Yes	13 (14.8)	20 (11.4)	1.8	0.62 – 5.40	0.278
No	75 (85.2)	156 (88.6)	1 (reference)	-	-
<b>Source</b>					
Yes	13 (14.8)	11 (6.25)	8.3	1.78 – 38.69	0.007
No	75 (85.2)	165 (93.75)	1 (reference)	-	-
<b>Fetching water outside occasionally</b>					
Yes	2 (2.3)	12 (6.8)	0.2	0.026 – 1.56	0.125
No	86 (97.7)	164 (93.2)	1 (reference)	-	-
<b>Fetching water outside weekly</b>					
Yes	11 (12.5)	10 (5.7)	2.2	0.93 – 5.18	0.071
No	77 (87.5)	166 (94.3)	1 (reference)	-	-
<b>Fetching water outside daily</b>					
Yes	10 (11.4)	27 (15.3)	0.7	0.31 – 1.55	0.368
No	78 (88.6)	149 (84.7)	1 (reference)	-	-
<b>Fetching water outside several times per</b>					
Yes	32 (36.4)	45 (25.6)	2	1.03 – 3.89	0.041
No	56 (63.6)	131 (74.4)	1 (reference)	-	-
<b>Fetching water outside by entering</b>					
Yes	42 (47.7)	50 (28.4)	4.6	2.06 – 10.40	0.000
No	46 (52.3)	126 (71.6)	1 (reference)	-	-
<b>Fetching water outside wearing open</b>					
Yes	17 (19.3)	53 (30.1)	0.44	0.21 – 0.93	0.030
No	71 (80.7)	123 (69.9)	1 (reference)	-	-
<b>Fetching water outside</b>					
Alone	32 (36.4)	58 (32.9)	1.3	0.65 – 2.43	0.498
Accompanied	56 (63.6)	118 (67.1)	1 (reference)	-	-
<b>Washing outside occasional</b>					
Yes	6 (6.8)	20 (11.4)	0.5	0.19 – 1.42	0.200
No	82 (93.2)	156 (88.6)	1 (reference)	-	-
<b>Washing outside weekly</b>					
Yes	13 (14.8)	18 (10.2)	1.6	0.71 – 3.78	0.252
No	75 (85.2)	158 (89.8)	1 (reference)	-	-
<b>Washing outside daily</b>					
Yes	14 (15.9)	20 (11.4)	1.5	0.71 – 3.33	0.279
No	74 (84.1)	156 (88.6)	1 (reference)	-	-
<b>Washing outside several times per day</b>					
Yes	34 (38.6)	37 (21.0)	5.6	2.24 – 14.03	0.000
No	54 (61.4)	139 (79)	1 (reference)	-	-
<b>Washing outside by entering water</b>					
Yes	64 (72.7)	84 (47.7)	4.89	2.31 – 10.34	0.000
No	24 (27.3)	92 (52.3)	1 (reference)	-	-
<b>Washing outside wearing open shoes</b>					
Yes	7 (7.9)	28 (15.9)	0.39	0.15 – 1.02	0.054

No	81 (92.1)	148 (84.1)	1 (reference)	-	-
Characteristics	Cases (%)	Controls (%)	Univariate	95% CI	P value
Washing outside					
Alone	28 (31.8)	39 (22.2)	2	0.99 – 4.02	0.051
Accompanied	60 (68.2)	137 (77.8)	1 (reference)	-	-
Swimming occasionally					
Yes	3 (3.4)	8 (4.5)	0.7	0.15 – 3.09	0.619
No	85 (96.6)	168 (95.5)	1 (reference)	-	-
Swimming weekly					
Yes	4 (4.5)	6 (3.4)	1.4	0.36 – 5.29	0.639
No	84 (95.5)	170 (96.6)	1 (reference)	-	-
Swimming daily					
Yes	5 (5.7)	9 (5.1)	1.1	0.36 – 3.49	0.845
No	83 (94.3)	167 (94.9)	1 (reference)	-	-
Swimming several times per day					
Yes	22 (25.0)	21 (11.9)	4.5	1.76 – 11.73	0.002
No	66 (75.0)	155 (88.1)	1 (reference)	-	-
Swimming by entering water					
Yes	33 (37.5)	44 (25.0)	2.8	1.30 – 6.11	0.009
No	55 (62.5)	132 (75.0)	1 (reference)	-	-
Swimming wearing open shoes					
Yes	3 (3.4)	11 (6.3)	0.5	0.14 – 1.95	0.334
No	85 (96.6)	165 (93.7)	1	-	-
Swimming					
Alone	17 (19.3)	22 (12.5)	2.9	0.99 – 8.52	0.053
Accompanied	71 (80.7)	154 (87.5)	1	-	-
Washing clothes occasionally					
Yes	5 (5.7)	12 (6.8)	0.8	0.27 – 2.46	0.715
No	83 (94.3)	164 (93.2)	1	-	-
Washing clothes weekly					
Yes	23 (26.1)	36 (20.5)	1.7	0.77 – 3.58	0.200
No	65 (73.9)	140 (79.5)	1	-	-
Washing clothes daily					
Yes	10 (11.4)	14 (7.9)	1.5	0.63 – 3.64	0.357
No	78 (88.6)	162 (92.1)	1 (reference)	-	-
Washing clothes several times per day					
Yes	13 (14.8)	10 (5.7)	4.6	1.46 – 14.76	0.009
No	75 (85.2)	166 (94.3)	1 (reference)	-	-
Washing clothes by entering water					
Yes	24 (27.3)	45 (25.6)	1.1	0.58 – 2.18	0.734
No	64 (72.7)	131 (74.4)	1 (reference)	-	-
Washing clothes wearing open shoes					
Yes	12 (13.6)	31 (17.6)	0.7	0.31 – 1.54	0.360
No	76 (86.4)	145 (82.4)	1 (reference)	-	-
Washing clothes outside					
Alone	29 (32.9)	33 (18.8)	2.9	1.39 – 6.10	0.004
Accompanied	59 (67.1)	143 (81.2)	1 (reference)	-	-
Washing the dishes occasionally					
Yes	7 (7.9)	5 (2.8)	2.8	0.89 – 8.82	0.079
No	81 (92.1)	171 (97.2)	1 (reference)	-	-
Washing the dishes weekly					
Yes	9 (10.2)	9 (5.1)	2.4	0.82 – 6.88	0.109
No	79 (89.8)	167 (94.9)	1 (reference)	-	-

Characteristics	Cases (%) (n=88)	Controls (%) (n=176)	Univariate OR	95% CI	P value
<b>Washing the dishes daily</b>					
Yes	5 (5.7)	7 (4.0)	1.4	0.45 – 4.50	0.542
No	83 (94.3)	169 (96.0)	1 (reference)	-	-
<b>Washing the dishes several times per day</b>					
Yes	16 (18.2)	14 (7.9)	4.9	1.59 - 15.49	0.006
No	72 (81.8)	162 (92.1)	1 (reference)	-	-
<b>Washing dishes by entering water</b>					
Yes	37 (42.0)	33 (18.7)	5.6	2.53 – 12.43	0.000
No	51 (58.0)	143 (81.3)	1 (reference)	-	-
<b>Washing dishes wearing open shoes</b>					
Yes	7 (7.9)	14 (7.9)	1	0.35 – 2.83	1.000
No	81 (92.1)	162 (92.1)	1 (reference)	-	-
<b>Washing dishes</b>					
Alone	23 (26.1)	20 (11.4)	5.5	2.02 – 15.08	0.001
Accompanied	65 (73.9)	156 (88.6)	1 (reference)	-	-
<b>Fishing occasionally</b>					
Yes	3 (3.4)	5 (2.8)	1.3	0.24 – 6.89	0.773
No	85 (96.6)	171 (97.2)	1 (reference)	-	-
<b>Fishing weekly</b>					
Yes	8 (9.1)	7 (4.0)	3.2	0.92 – 11.00	0.068
No	80 (90.9)	169 (96.0)	1 (reference)	-	-
<b>Fishing daily</b>					
Yes	3 (3.4)	4 (2.3)	1.6	0.31 – 8.40	0.567
No	85 (96.6)	172 (97.7)	1 (reference)	-	-
<b>Fishing several times per day</b>					
Yes	3 (3.4)	0 (0.0)	-	-	-
No	85 (96.6)	176 (100)	1 (reference)	-	-
<b>Fishing by entering water</b>					
Yes	17 (19.3)	16 (9.1)	6.6	1.83 – 23.81	0.004
No	71 (80.7)	160 (90.9)	1 (reference)	-	-
<b>Fishing wearing open shoes</b>					
Yes	1 (1.1)	5 (2.8)	0.3	0.03 – 3.12	0.311
No	87 (98.9)	171 (97.2)	1 (reference)	-	-
<b>Fishing</b>					
Alone	7 (7.9)	7 (3.9)	7.2	0.81 – 64.17	0.077
Accompanied	81 (92.1)	169 (96.1)	1 (reference)	-	-
<b>Knowledge about Buruli ulcer</b>					
Yes	57(64.8)	142(80.7)	0.4	0.22 – 0.75	0.004
No	31 (35.2)	34(19.3)	1 (reference)	-	-
<b>Sensitization on Buruli ulcer</b>					
Yes	43 (48.9)	107(60.8)	0.5	0.29 – 0.97	0.040
No	45 (51.1)	69(39.2)	1(reference)	-	-
<b>Precaution against Buruli ulcer</b>					
Yes	16 (18.2)	56 (31.8)	0.4	0.23 – 0.86	0.016
No	72 (81.8)	120 (68.2)	1 (reference)	-	-

**Note:** OR, unadjusted odds ratio comparing cases to the two controls; CI, confidence interval.

**Table 6: Multivariate analysis of the water contact activities of BU cases and controls sex and  $\pm$  1 year age-matched living along the river, Ouémé, Benin, 2018-20**

<b>Variables</b>	<b>Adjusted OR (95% CI)</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Main water point (lowland)	10.8 (1.09 - 107.59)	0.042
Fetching water outside weekly	3.9 (1.30 - 11.73)	0.015
Washing outside several times per day	10.4 (3.29 - 32.61)	0.000
Washing clothes alone	3.3 (1.28 - 8.48)	0.013
Washing the dishes occasionally	6.2 (1.43 - 27.23)	0.015
Washing the dishes weekly	4.3 (1.03 – 18.21)	0.046
Knowledge about Buruli ulcer	0.2 (0.07 – 0.39)	0.000

**Note:** OR, unadjusted odds ratio comparing cases to the two controls; CI, confidence interval.

## Figure captions

### **Figure 1: Localization and diversity of natural water sites used by local inhabitants**

(A) Localization of all unprotected and natural water sites visited in the study area. (B) Examples of unprotected water sources. (C) Classification of water sites according to their type.

### **Figure 2: Identification of human activities at natural water sites.**

(A) Location of the 11 prospected water sites. (B) Illustrations of the human activities related to unprotected water. (C) Frequency of activities observed at the water sites. (D) Age and sex distribution of people observed at water sites. (E) PCA analysis of activities related to water and age and sex distribution.

### **Figure 3: Factors involved in Buruli ulcer disease**

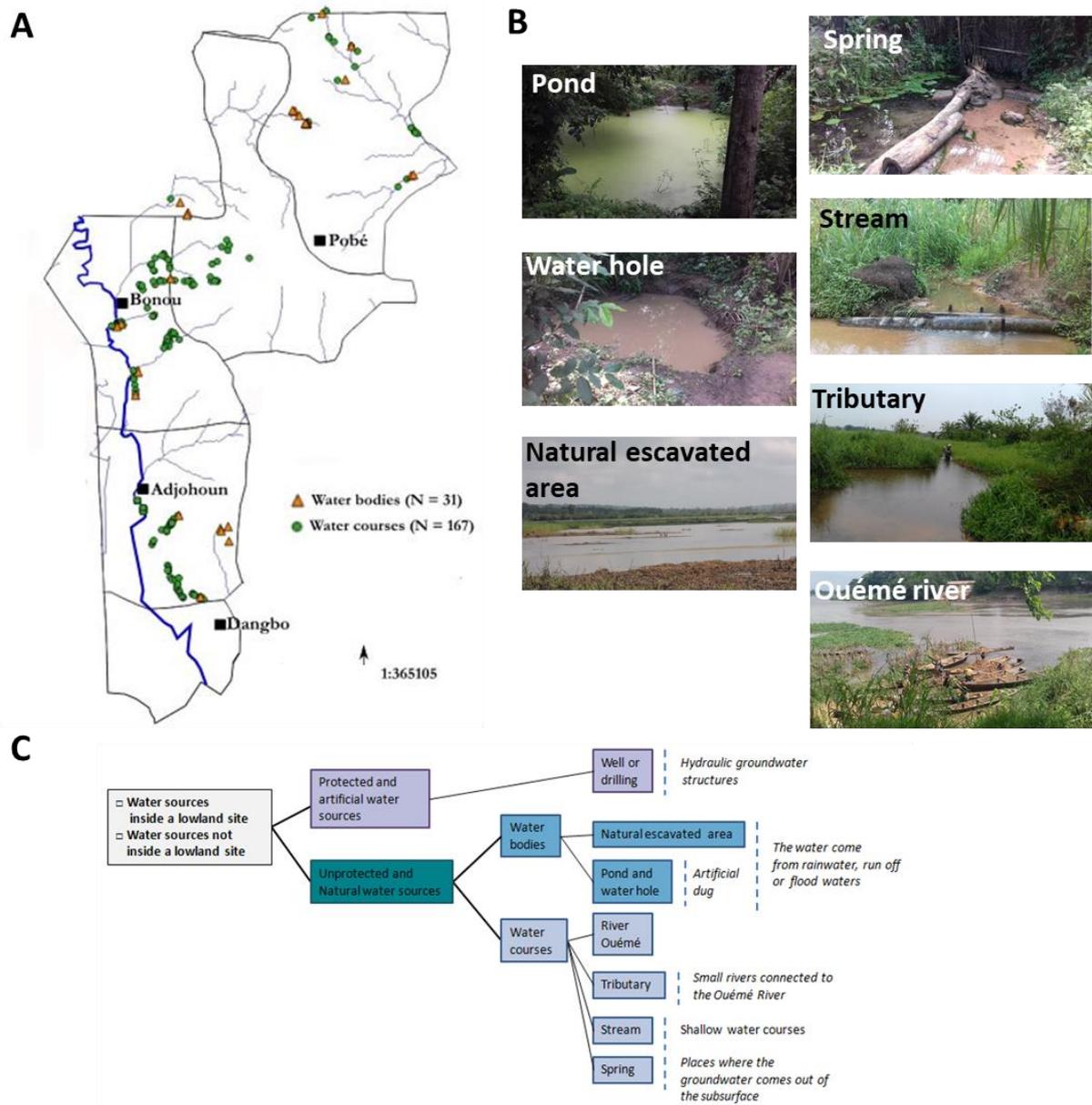
(A) Location of Buruli ulcer patients participating in the prospective case-control study. (B) Age and sex distribution of Buruli ulcer patients. (C) Proportion of patients using drilling water and/or water from unprotected water sites. (D) Mapping of lowlands using spatial analysis. (E) Number of Buruli ulcer cases according to the distance of a the river or a lowland site.

### **Figure 4: Detection of *M. ulcerans* at water sites**

(A) Location of environmental sampling at water sites. In green, water sites where no pool was positive for *M. ulcerans* DNA and in red, water sites where at least one pool was positive for *M. ulcerans* DNA. (B) Proportion of positive water sites located in lowlands.

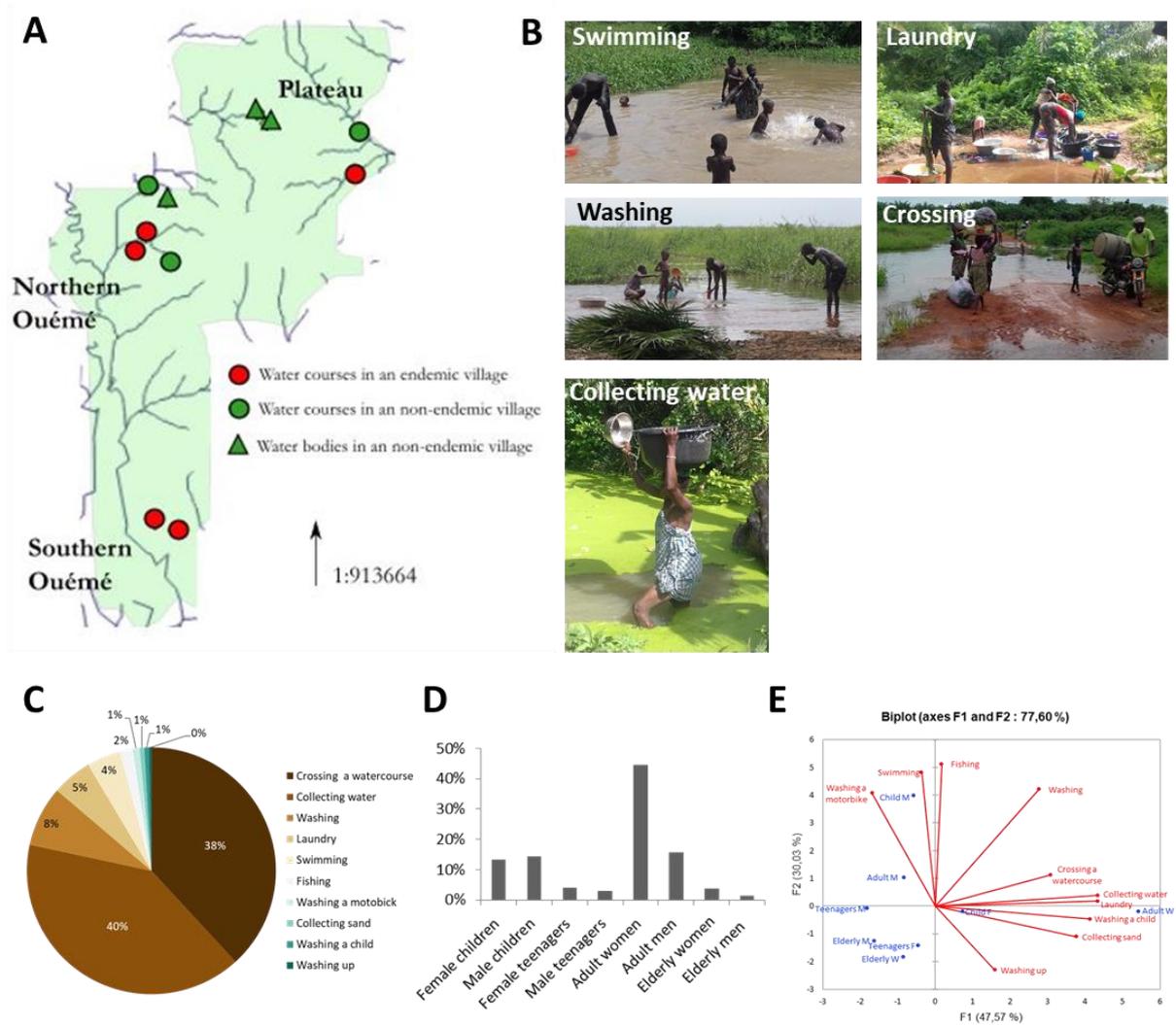
### **Figure 5: Link between humidity surface and endemicity**

(A) PCA analysis with monthly humidity surface by arrondissement and endemicity. (B) Example of surface humidity for two arrondissements: Gangban and Dame-Wogon. (C) Projection of axis 1 of the PCA. (D) projection of axis 2 of the PCA. (E) Incidence of Buruli ulcer in the arrondissements of the study area.



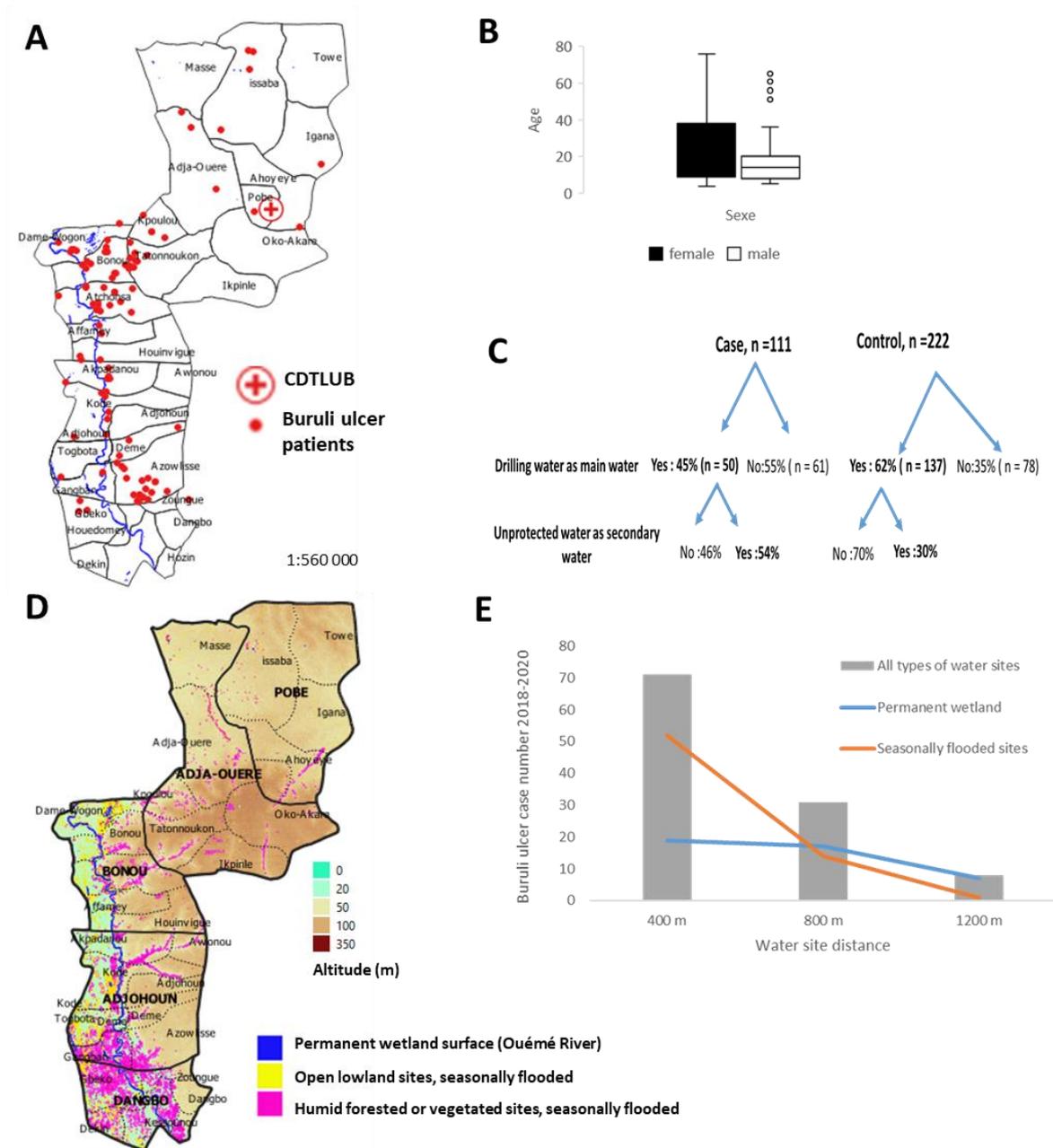
**Figure 1: Localization and diversity of natural water sites used by local inhabitants**

(A) Localization of all unprotected and natural water sites visited in the study area. (B) Examples of unprotected water sources. (C) Classification of water sites according to their type.



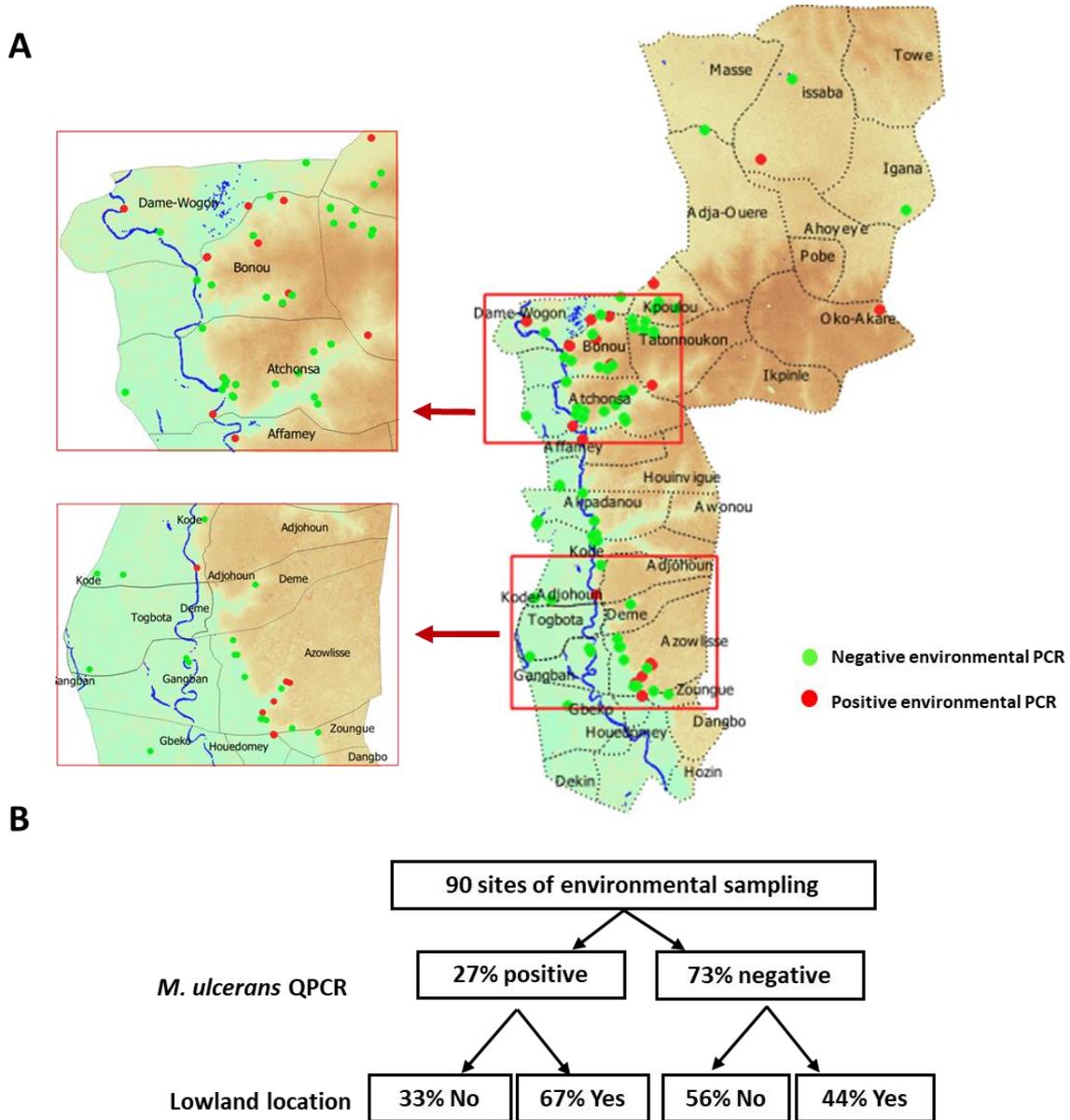
**Figure 2: Identification of human activities at natural water sites.**

(A) Location of the 11 prospected water sites. (B) Illustrations of the human activities related to unprotected water. (C) Frequency of activities observed at the water sites. (D) Age and sex distribution of people observed at water sites. (E) PCA analysis of activities related to water and age and sex distribution.



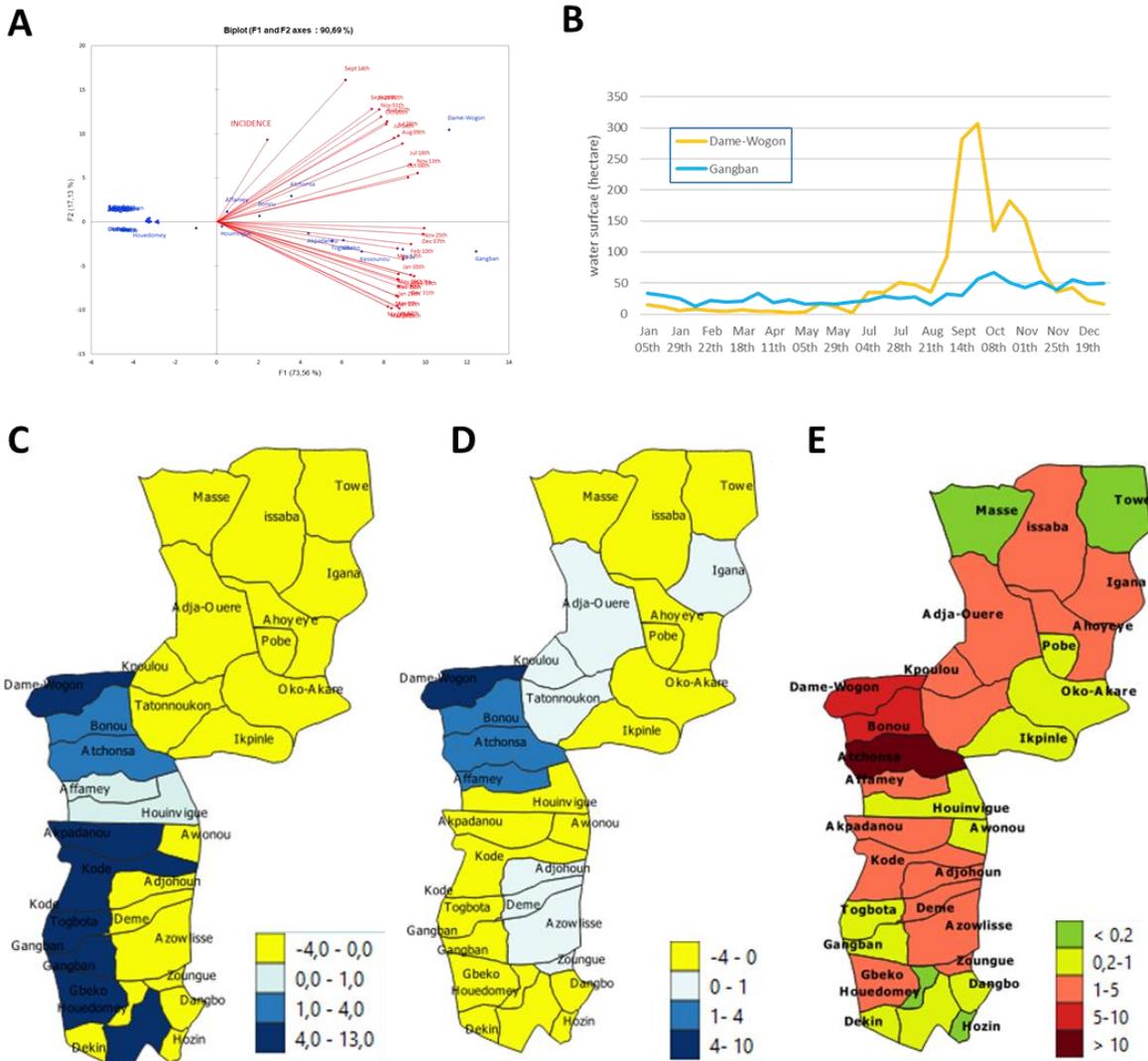
**Figure 3: Factors involved in Buruli ulcer disease**

(A) Location of Buruli ulcer patients participating in the prospective case-control study. (B) Age and sex distribution of Buruli ulcer patients. (C) Proportion of patients using drilling water and/or water from unprotected water sites. (D) Mapping of lowlands using spatial analysis. (E) Number of Buruli ulcer cases according to the distance of a the river or a lowland site.



**Figure 4: Detection of *M. ulcerans* at water sites**

(A) Location of environmental sampling at water sites. In green, water sites where no pool was positive for *M. ulcerans* DNA and in red, water sites where at least one pool was positive for *M. ulcerans* DNA. (B) Proportion of positive water sites located in lowlands.



**Figure 5: Link between humidity surface and endemicity**

(A) PCA analysis with monthly humidity surface by arrondissement and endemicity. (B) Example of surface humidity for two arrondissements: Gangban and Dame-Wogon. (C) Projection of axis 1 of the PCA. (D) projection of axis 2 of the PCA. (E) Incidence of Buruli ulcer in the arrondissements of the study area.

## Supplementary information S1

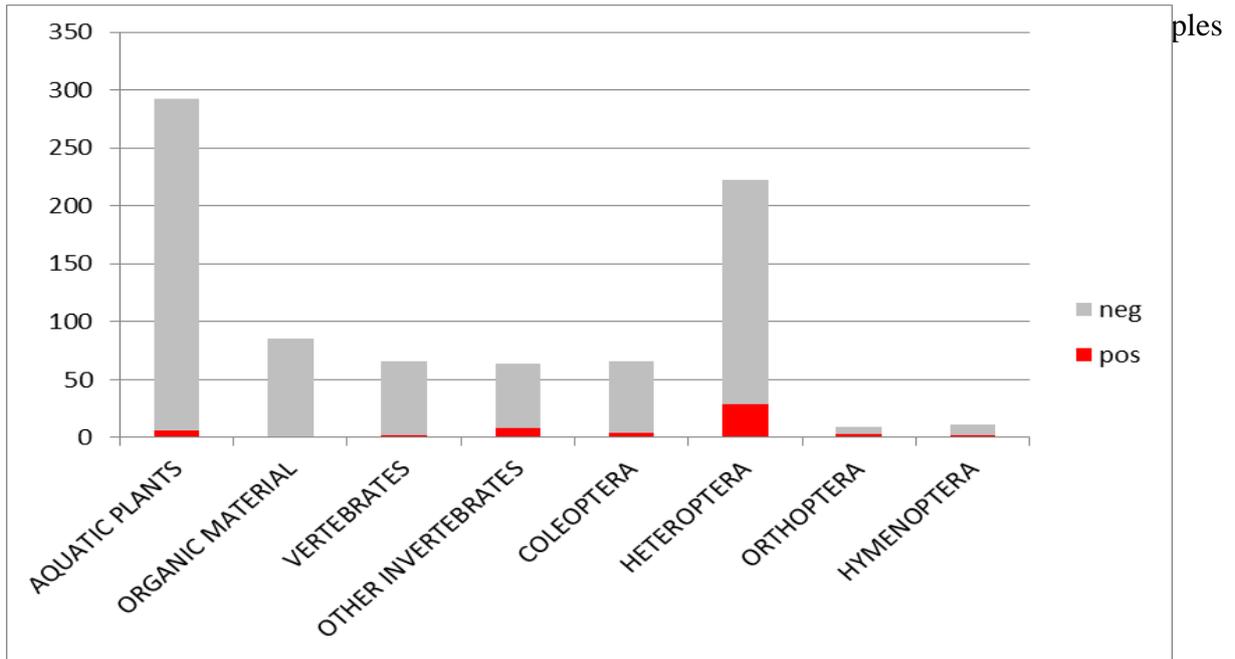
**Table 7:** Number of environmental samples collected in the study and detection of *M. ulcerans* by qPCR

Type of samples	Number of pools	Number of qPCR positive pools*	Number of qPCR negative pools	% positive pools
AQUATIC PLANTS	292	6	286	2%
ORGANIC MATERIAL	85	1	84	1%
VERTEBRATES**	66	2	64	3%
COLEOPTERA	66	4	62	6%
HETEROPTERA	222	29	193	13%
ORTHOPTERA	9	3	6	33%
HYMENOPTERA	11	2	9	18%
OTHER INVERTEBRATES***	64	8	56	13%
<b>Total général</b>	<b>815</b>	<b>55</b>	<b>760</b>	<b>7%</b>

\* Samples were considered positive only if both the IS2404 sequence and the sequence encoding the KR domain of *mls* were detected, with threshold cycle (Ct) values strictly <36 cycles.

\*\* Vertebrates include fish and amphibian

\*\*\*Other invertebrates include mollusca, arachnida, decapoda, odonata.



## **Chapitre 6 : Discussion générale**

L'objectif de notre thèse était de participer à la compréhension des facteurs associés à la diminution de l'incidence de l'ulcère de Buruli ces dix dernières années afin de proposer un modèle de prévention primaire contre l'infection à *Mu*. Dans ce but, nos travaux se sont articulés autour de trois axes. Tout d'abord, nous sommes intéressés aux facteurs environnementaux et anthropiques modifiant l'incidence de la maladie. Nous avons ensuite mesuré le taux de contamination environnementale par *Mu* afin d'identifier les environnements où l'homme peut se contaminer lors de ses activités. Nous avons enfin analysé pour la première fois, les interactions entre l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mu* grâce à la triangulation des résultats d'études épidémiologique, environnementale et de la géographie de la santé.

Un modèle de prévention primaire a été enfin développé comme outil d'interventions en santé publique au sein des communautés endémiques pour la première fois afin de prévenir l'apparition de l'UB par la réduction des risques, soit en modifiant les comportements ou les expositions qui peuvent l'entraîner.

Nous avons discuté des différents biais potentiels de ce travail dans les articles qui constituent la thèse. Plusieurs méthodes d'étude ont été utilisées en fonction des objectifs poursuivis et des différentes questions de recherche. L'objectif général de notre travail de thèse est atteint à travers les différents volets qu'il couvre. Le présent chapitre consacré à la discussion générale est structuré en trois parties à savoir :

- ✓ L'impact de l'accès et l'utilisation de l'eau du forage sur la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli au Bénin par la réalisation d'étude cas-témoins prospective,
- ✓ Les résultats d'une étude de terrain dans le Sud-Est du Bénin, combinant des analyses épidémiologiques, environnementales et géographiques pour proposer des stratégies préventives contre l'ulcère de Buruli
- ✓ Le développement d'un modèle de prévention primaire : un outil d'interventions en santé publique au sein des communautés endémiques.

## **6.1 Impact de l'accès et l'utilisation de l'eau du forage sur la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli au Bénin**

Au Bénin, comme dans la plupart des pays endémiques d'Afrique, le système de santé est structuré en trois niveaux. À l'échelle nationale, les activités de contrôle sont organisées par un programme national de lutte. Le niveau intermédiaire, composé d'hôpitaux régionaux et

d'autorités de santé publique, assure une surveillance intégrée de toutes les maladies. Les activités sont mises en œuvre au niveau de quatre centres de référence, de détection et de traitement de l'ulcère de Buruli, répartis dans les principales régions endémiques du Bénin. Les agents de santé de ces établissements ont une expérience considérable dans le diagnostic et le traitement des patients atteints de l'ulcère de Buruli.

La distribution spatio-temporelle de l'UB au Bénin sur les dix dernières années montre une constante dans quelques communes dites endémiques, et qui sont toutes localisées au sud du Pays, autour des cours d'eau. Cette observation est conforme aux données de la littérature qui rapportent que l'UB est une maladie présente dans les zones rurales situées à proximité des zones humides (étangs, marais, retenues, mares) et des rivières à faible débit, en particulier dans les zones inondables [90, 106, 167, 168]. Au niveau national, il a été observé, une diminution rapide du nombre de cas d'UB entre 2008 et 2013, suivi d'une diminution plus lente entre 2013 et 2018. La diminution du nombre de cas d'UB a été observée, dans d'autres pays également de la sous-région tels que le Ghana, le Cameroun, la Côte d'Ivoire [12, 25]. Cependant, l'ulcère de Buruli a une distribution très ciblée dans les zones endémiques, avec la coexistence de villages endémiques et non endémiques dans la même commune voire le même arrondissement [168].

Au niveau local, cette diminution est différentielle entre les départements de l'Ouémé et du Plateau, bien qu'ils bénéficient d'un accès aux soins comparable et que la lutte contre l'ulcère de Buruli est assurée par le même CDTLUB de Pobè [158]. Après une importante augmentation de 2003 à 2006, le nombre de nouveaux cas a diminué considérablement dans l'Ouémé avec 228 cas diagnostiqués en 2003 contre 75 en 2014, soit une diminution de 67%. Dans le plateau, le nombre de cas (effectif plus petit que dans l'Ouémé) en 2016 est sensiblement le même qu'en 2005 même s'il existe des fluctuations durant cette période [2].

Les raisons exactes de cette réduction du nombre de cas d'UB au Bénin en l'occurrence dans les départements de l'Ouémé et du Plateau, ne sont pas connues. Aucune étude n'a été menée pour élucider cette diminution différentielle du nombre de cas. De plus, les données de la littérature sur les études écologiques, de suivi de cohorte et de dépistage actif [67, 68, 127, 144, 159-161, 169] couplées à celles archivées au MEM sur les nouveaux puits de forages sur la même période, ont révélé une augmentation continue du nombre de forage facilitant l'accès à de l'eau protégée tout particulièrement dans les zones endémiques de l'Ouémé.

Dans ce contexte, notre travail a consisté à réaliser une étude épidémiologique cas – témoins rétrospective sur les anciens patients atteints d'UB sur la même période et ayant pour objectif d'étudier les impacts de l'accès et l'utilisation de l'eau du forage sur la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dans une zone définie dans le département de l'Ouémé.

Les résultats de cette étude ayant porté sur 106 anciens patients d'UB du CDTLUB-Pobè et 212 témoins ont montré que l'accès et l'utilisation régulière de l'eau du forage pour le lavage, le bain, la consommation ou la cuisson sont protecteurs contre l'UB. Nous avons ainsi identifié l'utilisation de l'eau du forage comme un facteur diminuant le risque d'infection par *Mu*. Les résultats de cette étude, confirmeraient l'hypothèse selon laquelle l'accès et l'utilisation de l'eau d'un point d'eau protégé diminuent l'incidence de l'UB. Il ressort ainsi de nos travaux que l'implémentation de nouveaux forages de puits et son accessibilité pourraient être crucial pour diminuer l'incidence de l'ulcère de Buruli.

Cependant, il y a de nombreuses habitudes coutumières à très haut risque dans certaines régions du Bénin en l'occurrence dans les départements de l'Ouémé et du Plateau. L'accès et l'utilisation de l'eau du forage, n'empêcherait pas l'utilisation de l'eau de rivière par les populations riveraines. Certains types de comportements ou d'activités peuvent persister et conférer un risque élevé de développer l'ulcère de Buruli malgré la disponibilité de l'eau du forage. L'identification de ces types de comportements et d'activités est essentielle pour améliorer les stratégies préventives.

Pour limiter l'incidence de l'UB dans d'autres pays endémiques, il est crucial d'identifier les réservoirs précis et les voies de transmission des bacilles. À cet effet, l'une des hypothèses plausibles serait que l'homme soit un réservoir principal des bacilles [170, 171] et que le traitement antibiotique pourrait briser le cycle épidémique. Cependant, l'augmentation considérable des cas d'UB en Australie depuis 2011 et l'extinction des flambées avant l'introduction d'antibiotiques [94, 172] ne confirment pas totalement cette hypothèse car l'Australie dispose d'un système de santé bien développé.

Les résultats de plusieurs études épidémiologiques ont permis d'identifier les milieux aquatiques comme des zones majeures de contamination [9, 102, 173, 174]. D'autres facteurs en dehors de l'accès et l'utilisation de l'eau d'un point d'eau protégé pourraient également être impliqués dans la diminution de l'incidence de l'UB dans la plupart des pays endémiques, tels que les changements dans l'aménagement du territoire, y compris le développement urbain et les changements dans la pratique agricole. Ces facteurs supplémentaires plausibles pourraient

faire l'objet d'études plus approfondies à plus grande échelle dans plusieurs communes endémiques des départements de l'Ouémé et du Plateau.

En accord avec les autres études épidémiologiques, nos analyses montrent également que les enfants de moins de 15 ans sont les sujets les plus vulnérables [15, 175]. Toutefois, l'analyse de nos données, tout comme celles de la littérature, ne révèle pas de prédominance d'un sexe [84].

Nos résultats diffèrent également de ceux retrouvés en Australie où l'ulcère de Buruli prédomine chez les adultes (>15 ans) [84, 91]. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait qu'en Afrique les enfants sont généralement exposés à l'environnement en s'adonnant plus à des activités aquatiques sans le contrôle des parents.

L'une des limites de l'étude était la réalisation d'une étude cas-témoins rétrospective avec la possibilité associée aux biais de mémoire. Toutefois, le questionnaire a été spécifiquement conçu pour minimiser ces biais. Le questionnaire exigeait notamment que le participant présente en détail tous les comportements liés aux activités aquatiques lors de la période où les cas avaient développé la maladie. De plus, nous n'avons pas inclus plusieurs facteurs de confusion dans le questionnaire, pour lesquels on aurait pu s'attendre à des réponses moins fiables (par exemple, la durée des activités).

Bien que les travaux antérieurs aient fourni des informations importantes sur les facteurs de risque, l'épidémiologie et les perspectives cliniques de la maladie, la compréhension de l'écologie bactérienne, l'interaction entre le milieu de vie, la bactérie et l'homme restent tout aussi importantes pour mieux comprendre et prévenir cette maladie mystérieuse.

Au vu de tous ces résultats et des plausibles limites de notre étude cas – témoins rétrospective, une étude prospective permettant l'analyse des caractéristiques comportementales, cliniques, biologiques et environnementales combinées aux données du système d'information climatique et géographique, offrirait de meilleures chances d'élaborer des stratégies préventives efficaces en tant qu'interventions de santé publique.

C'est donc pour répondre à cette nouvelle problématique, qu'une étude de terrain combinant des analyses épidémiologique, environnementale et géographique pouvant permettre de proposer des stratégies préventives contre l'UB a été initiée.

## **6.2 Etude de terrain dans le Sud-Est du Bénin, combinant des analyses épidémiologiques, environnementales et géographiques pour proposer des stratégies préventives contre l'ulcère de Buruli**

A l'issue de la première étude rétrospective, nous avons remarqué malgré les résultats originaux trouvés, qu'il est fort probable que les facteurs explicatifs de la diminution de l'incidence de l'UB soient plus complexes à identifier. Dans ce contexte, notre travail a consisté à réaliser une nouvelle étude épidémiologique cas-témoins prospective sur les nouveaux patients atteints d'UB du CDTLUB-Pobè de 2018 à 2020 combinée à des études environnementales et en géographie de la santé. Notre objectif était d'étudier les facteurs environnementaux et anthropiques favorisant une diminution de l'incidence de l'ulcère de Buruli afin de développer de nouvelles stratégies préventives adaptées aux zones endémiques et aux modes de vie des populations touchées par l'UB.

Dans un premier temps, nous avons recueilli des informations sur les habitudes de vie et les usages de l'eau afin de comparer les pratiques des patients ayant contracté l'ulcère de Buruli avec celles de personnes au profil similaire exemptes de la maladie. Ce travail nous a permis d'identifier des habitudes de vie ou usages de l'eau qui auront pu exposer les personnes à la mycobactérie. Nous avons ensuite identifié les zones et activités les plus à risque en recherchant par PCR la présence de la mycobactérie dans l'environnement de vie de ces patients. Plusieurs observations des pratiques de vie et activités quotidiennes, immersions, entretiens formels et informels avec la population ont été réalisés à cet effet.

La lutte contre les MTN dont l'UB s'est principalement concentrée sur l'antibiothérapie et la gestion des cas. L'un des aspects ayant moins d'attention est le rôle que pourraient jouer l'accès à l'eau, à l'assainissement et à l'hygiène adéquats et des mesures préventives personnelles pour réduire l'exposition à l'infection [176]. Notre étude fait partie de ces rares travaux qui s'intéressent à ces aspects négligés dans la lutte contre les MTN.

Les résultats de cette étude ont confirmé le rôle protecteur de l'accès et l'utilisation de l'eau des forages rapportés dans notre précédente étude cas-témoins rétrospective [2]. Ces résultats corroborent avec les résultats de certaines études réalisées au Bénin qui ont permis de mettre en évidence une diminution progressive de l'incidence avec le développement et le défrichage des zones basses en plus de l'amélioration des techniques de gestion de l'eau [12, 77].

Toutefois, dans notre présente étude cas-témoins prospective, nous constatons à plus grande échelle que l'utilisation de points d'eau protégés (eau de forage, puits) est plus fréquemment

rapportée chez les témoins que les cas. Nous avons également constaté que le fait d'être le seul responsable à aller chercher de l'eau à l'extérieur et de faire partie de grands ménages composés de beaucoup de personnes étaient indépendamment associés à l'augmentation de l'incidence de l'UB. Nous pourrions expliquer la relation entre l'augmentation du nombre de personnes par ménage et l'incidence par le fait que les grands ménages ont besoin de plus d'eau et ont donc plus de risques d'entrer en contact avec des points d'eau non protégés à cause de l'augmentation de la fréquence de contact avec ces derniers. Nous avons aussi observé que ce n'est pas seulement le contact avec les sources d'eau non protégées et naturelles qui est le plus associé au risque mais la fréquence et surtout le fait d'y aller seul à de nombreuses heures de la journée, en particulier lorsque ces sources sont situées dans des bas-fonds régulièrement inondés ou irrigués. D'après les résultats de notre étude environnementale et biologique, une forte prévalence de l'ulcère de Buruli a été enregistrée dans les villages proches du site de bas-fonds. De plus, *Mu* a été plus souvent détecté dans les organismes aquatiques provenant de la plaine d'inondation de l'Ouémé que dans les sources d'eau des hautes terres (communication personnelle).

Le risque de contamination peut être ainsi considéré comme faible lorsque les sources d'eau fréquentées sont caractérisées par une circulation d'eau, un entretien régulier des abords et parfois des aménagements de protection [12, 77].

Les variables démographiques des personnes atteintes de l'UB ont été revues par de nombreux auteurs, sans qu'aucun consensus n'ait été atteint quant à leur rôle en tant que modificateur du risque de contracter la maladie [177, 178]. Les principaux résultats obtenus rapportent un rôle bipartite de l'âge et du sexe dans la susceptibilité à l'UB, car la maladie est plus fréquemment observée chez les enfants, en particulier les hommes, et chez les personnes âgées. Ces résultats sont contraires à ceux rapportés par Vincent et al 2014 [15] et à nos résultats trouvés dans la présente étude.

Dans notre cohorte actuelle, il y a plus de femmes adultes infectées par *Mu* que d'hommes adultes. Cela nous permet de soupçonner que les activités quotidiennes de ces femmes sont associées à un plus grand risque d'infection comme le démontre notre étude cas-témoins prospective [2].

Les enfants de moins de 15 ans représentent plus de 50% des patients atteints d'UB. Certaines études ont indiqué qu'il n'y avait pas de différence dans la répartition des cas d'UB parmi les enfants masculins et féminins [12], mais d'autres ont indiqué que la prévalence chez les jeunes

garçons est plus élevée que chez les filles [12]. Chez les jeunes générations, il a été précédemment soutenu que ces différences pouvaient s'expliquer par une exposition accrue à *Mu*, principalement en raison du comportement plus erratique qui rend les enfants plus enclins à des lésions de la peau, ainsi que leur probabilité de rester à proximité des milieux aquatiques [54, 177, 179].

Lors de notre étude de terrain, nous avons remarqué que patauger et aider les parents à pêcher dans les rivières est l'une des activités qui ne concerne que les enfants et plus particulièrement les garçons, qui ne portent pas de vêtements de protection, notamment dans les plans d'eau calmes pendant la saison des pluies, ce qui augmenterait le risque d'exposition. Cependant, les résultats d'études récentes rapportant des cas d'UB chez les personnes âgées ont jeté une suspicion plus forte sur l'âge en tant que modulateur de processus intrinsèque, vraisemblablement immunologique, phénomène qui pourrait être transversal à travers les générations [63, 177].

Les connaissances actuelles sur le rôle de l'âge et le sexe dans le risque de contracter l'UB ne permettent encore de savoir exactement comment cela se réalise par absence de consensus des résultats des différents travaux.

Une étude approfondie sur ces aspects de l'épidémiologie de l'UB sur une plus grande cohorte de patients confirmés par PCR, dans plusieurs pays endémiques à faciès différents serait très utile pour la mise en œuvre d'interventions efficaces dans les zones endémiques.

En ce qui concerne les facteurs de risque et de protection contre l'UB, les principales études épidémiologiques montrent que l'environnement aquatique est le principal réservoir de *Mu*. Les résultats rapportés dans la littérature sont similaires à ceux de notre étude cas – témoins prospective qui révèle le risque élevé de contracter l'UB en menant des activités quotidiennes au contact des rivières [2]. De plus, de nombreuses études environnementales, dont celles réalisées au Bénin dans le département de l'Ouémé, ont démontré la présence d'ADN de *Mu* dans des vertébrés et invertébrés aquatiques [64, 67, 68, 72, 74, 163] et particulièrement chez les punaises aquatiques. Les travaux similaires réalisés au Cameroun ont montré qu'il y avait des variations saisonnières vu le taux de colonisation des insectes aquatiques par *Mu* [12, 162]. Ces résultats pourraient expliquer la saisonnalité dans l'apparition des cas humains dans ces zones endémiques.

Au Bénin, plusieurs études réalisées dans plusieurs départements, dont celui de l'Ouémé, a montré qu'il existe un lien entre la présence de *Mu* dans l'environnement aquatique et l'incidence de l'infection à *Mu*. Cependant, ces études n'ont jamais étudié en profondeur les

relations entre fréquentation des différentes zones, activités humaines, et taux de « contamination environnementale ».

Dans la présente étude de terrain, nous avons effectué une analyse couplée des données épidémiologiques, géographiques, spatiales et la détection de *Mu* au cours de la même période dans l'environnement de vie des sujets, fournissant de nouvelles connaissances sur les facteurs de risque et de protection. Cette approche novatrice utilisée permet de dépasser les limites des études épidémiologiques se déroulant en milieu hospitalier et ne prenant pas en compte les réelles conditions de vie et d'environnement des patients. À notre connaissance, il s'agit de la première étude détaillée à utiliser cette approche multidisciplinaire.

Les observations itinérantes sur le terrain nous ont permis d'identifier les caractéristiques hydro- géographiques des points d'accès à l'eau fréquentés en milieu rural endémique afin de répertorier les activités et attitudes de tous les habitants sur le long terme. À l'issue de ses observations réalisées pendant plusieurs mois, deux principales activités (collecte d'eau et traversée d'un cours d'eau pour aller chercher des bois de chauffe par exemple) représentaient plus de 80% de l'ensemble des activités observées avec une prédominance d'adultes de sexe féminin en charge de ces activités. Ces résultats sont très importants pour l'implémentation d'une stratégie de prévention primaire car ils nous permettront de bien cibler la catégorie de la population concernée. Ces résultats pourraient expliquer le fait que nous ayons obtenu plus de femmes adultes atteintes d'UB dans notre cohorte d'étude. Dans ces zones endémiques, selon la coutume, c'est la femme qui s'occupe des principales activités du ménage dont la collecte d'eau, la recherche des bois de chauffe en traversant les cours d'eau. Lors de ses activités, les enfants sont très souvent portés au dos ou transportés sur les épaules de leurs mères, ce qui diminuerait le risque pour ces enfants de contracter l'UB dans ce contexte.

Les résultats de récentes études cas – témoins réalisées au Ghana et au Togo, rapportent que le fait de traverser un cours d'eau à pied pour rejoindre les champs cultivés ou un village voisin est un facteur de risque [12, 162]. Ces résultats confirment nos observations de terrain où nous avons remarqué que dans les zones plus endémiques, les sujets ont un contact prolongé avec l'eau durant toute la journée de travail. Cela favoriserait le contact avec *Mu* par le biais des plantes ou de la faune aquatique, en particulier pendant la saison des pluies. Nous avons remarqué que la marche prolongée dans l'eau était la pratique la plus fréquemment observée dans le périmètre des bas-fonds. Ces résultats d'observations complètent et confirment les résultats de notre étude épidémiologique cas – témoins prospective qui nous ont permis de

mettre en évidence pour la première fois le risque très élevé de contamination à *Mu* dans les zones de bas-fonds. C'est aussi dans ces zones de bas-fonds que nous avons collecté plus de vertébrés et invertébrés aquatiques contaminés par *Mu*. Ces résultats pourraient expliquer la contamination différentielle que nous avons observée au sein d'une même population vivant dans la même commune voire arrondissement. Pour deux personnes vivant dans le même village et allant au même point d'eau non protégé (rivière, ruisseau, source) pour leurs activités quotidiennes, celle qui mène ses activités au niveau des zones du bas-fonds du point d'eau à dix fois plus de risque que celle qui mène ses activités au niveau du même point d'eau mais pas dans la zone du bas-fond.

Lors de notre étude de terrain, nous avons aussi observé que ces femmes roulent le bas du vêtement exposant le bas du corps. Nos observations confirment les résultats de plusieurs études publiées, rapportant que l'étendue des lésions est significativement corrélée avec les parties du corps non vêtues [6, 180].

Le fait d'aller chercher de l'eau à l'extérieur de son domicile » pour boire, cuisiner, faire la vaisselle ou se laver à l'extérieur plusieurs fois par jour est un facteur de risque d'après les résultats de notre présente étude prospective comme rapporté dans de nombreuses études cas-témoins publiées au Bénin [12].

Nos résultats révèlent aussi que la connaissance sur l'UB et la réalisation de la vaisselle à la maison sans contact avec un point d'eau non protégé protègent contre le risque de contracter l'UB. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par Raymond en Côte d'Ivoire [181]. L'éducation sanitaire aurait donc un impact positif sur la santé de la population.

Le point fort de cette étude cas-témoins est le recrutement de cas incidents, permettant une évaluation détaillée des expositions dans une période bien définie, au cours des six mois précédant l'apparition des symptômes. Les études cas-témoins offrent une meilleure conception, mais des biais d'information et de sélection peuvent néanmoins survenir. Pour minimiser le biais d'information, les questionnaires de cette étude ont été administrés au moment du diagnostic des patients. Tous les témoins ont été rendus comparables aux cas sur la base d'un ou généralement plusieurs critères (appariement individuel). L'appariement visait à rendre les cas et les témoins identiques ou similaires pour les facteurs potentiels de confusion. Une autre limite de ce type d'étude résiderait dans le choix du groupe témoin et la qualité de la mesure de l'exposition. Cependant, l'ajustement des facteurs de confusion par l'analyse multivariable effectuée nous ont permis de minimiser au maximum les biais. De plus, nos résultats de l'étude

cas-témoins convergent avec ceux des données socio-environnementales rapportés dans ce travail.

Enfin, à partir des images radar, nous avons remarqué que la submersion temporaire de la surface terrestre par les eaux de crue et de ruissellement est plus directement liée à l'incidence de l'ulcère de Buruli qu'aux surfaces permanentes de l'eau. Dans les différents arrondissements d'étude, les niveaux de surface et d'eau des espaces aquatiques varient considérablement d'une saison à l'autre. Ces résultats corroborent avec les scénarii proposés dans certaines études publiées selon lesquels *Mu*, une fois introduit dans un nouvel environnement, se développe et se propage au lieu de devenir un pathogène immobile [132]. Il se pourrait donc que *Mu*, une fois introduit dans des sites aquatiques temporaires ou semi-permanents puisse disparaître, comme c'est le cas dans les villages endémiques du département du Plateau au Bénin.

Malgré les études épidémiologique et environnementale menées par le consortium, le mode de transmission exact de *Mu* reste encore inconnu. Cependant, les études ont apporté de nouvelles connaissances qui contribuent à une meilleure compréhension de l'énigme de la transmission et des zones les plus à risques de transmission. Par exemple, certaines corrélations entre les facteurs environnementaux et l'incidence de l'UB ont pu être mises en évidence par les résultats de nos travaux, qui ont confirmé l'existence de facteurs de risque comportementaux pour contracter la maladie, tels que les activités journalières en l'occurrence la lessive, la pêche, le lavage, la vaisselle et l'agriculture dans les zones marécageuses ou de bas-fonds et la pratique en solo de ces activités. L'ADN de *Mu* a été détecté dans de nombreuses sources environnementales, en particulier aquatiques, mais la manière dont les bactéries pénètrent dans les tissus cutanés n'est pas claire. L'hypothèse de la pénétration des bactéries par les plaies ouvertes a été testée sur un modèle de cobaye par des chercheurs de l'Université du Tennessee.

Alors que l'injection de *Mu* dans la peau a entraîné le développement de lésions, les chercheurs n'ont pas été en mesure de produire une infection par application topique de *Mu* sur des abrasions ouvertes. Ces résultats suggèrent que l'UB n'est probablement pas due à l'entrée passive de bactéries dans les tissus cutanés plus profonds via des abrasions cutanées superficielles.

Les approches transdisciplinaires de la recherche - action sont prometteuses et actuellement très encouragées par de nombreuses institutions. Le champ d'application est multidimensionnel et l'objectif est de créer un impact basé sur la recherche et les preuves directement applicables aux

conditions de vie réelles des personnes vivant dans les zones endémiques des maladies tropicales négligées en l'occurrence l'UB.

### **6.3 Le développement d'un modèle de prévention primaire : un outil d'interventions en santé publique au sein des communautés endémiques**

Malgré les progrès réalisés dans la lutte contre l'UB, tant que l'on n'a pas entièrement compris le mode de transmission et en absence de vaccin, les principales mesures de lutte actuelles contre l'UB demeure le contrôle à travers la réduction de la morbidité et des conséquences socioéconomiques qui lui sont associées. A ce jour, l'absence d'un outil efficient et simple de prévention primaire afin de réduire considérablement l'incidence de l'UB par une action au niveau des causes et des facteurs de risque spécifiques fait cruellement défaut. La mise en place de mesures préventives est un élément clef pour éliminer une maladie infectieuse. Cet outil de prévention primaire pourrait être axé sur (i) l'ensemble de la population dans le but de réduire le risque moyen (stratégie axée sur la population ou de « masse »), et/ou sur (ii) les personnes à haut risque par suite d'expositions particulières (stratégie axée sur les « sujets à haut risque »). A ce jour, toutes les stratégies visant à obtenir un tel outil ont échoué en raison de la méconnaissance du mode exact de transmission de *Mu*. Nous avons entrepris à travers ces différentes études, le développement de cet outil qui semble particulièrement adapté aux conditions de vie des sujets dans les zones endémiques tropicales. Ce travail a été réalisé dans des perspectives d'applications médicales. Le développement de mesures préventives adaptées requière le développement d'une approche globale intégrant une meilleure connaissance des comportements humains.

Nos résultats ont également révélé les avantages de changer d'approche de lutte et de raisonnement non pas seulement selon des implémentations instantanées, mais sur la base d'espaces de vie contenant à la fois des points d'accès « sûrs » à l'eau et d'autres points d'accès à l'eau auxquels les humains peuvent être exposés au *Mu*, ainsi que les zones humides semi-permanentes ou saisonnières potentiellement risquées visitées pour des raisons autres que la collecte d'eau. Les comportements et pratiques territoriales dans les zones de bas-fonds ne se limitent pas seulement aux activités domestiques. Les villageois développent des activités de production de riz, de maïs et de maraîchage afin de diversifier leurs sources de revenus et d'approvisionner les marchés environs et des villes en produits frais [12].

À partir de notre étude prospective de cohorte, nous avons détecté la présence de *Mu* dans des organismes aquatiques collectés dans des champs inondés une partie de l'année et fréquentés

par certains patients pour des travaux agricoles. Ces derniers pourraient être infectés par la bactérie lors de leurs activités champêtres malgré qu'ils utilisent des points d'eau protégés pour leurs besoins en eau quotidien.

L'intégration récente de toutes les maladies négligées cutanées – ulcère de Buruli, leishmaniose cutanée, lèpre, pian et d'autres -, dans des programmes globaux, devrait pouvoir renforcer les réponses opérationnelles sur le terrain. Cette stratégie devrait améliorer la détection de l'ulcère de Buruli à des stades plus précoces, ce qui est crucial pour réduire la nécessité d'une intervention chirurgicale. Toutefois, il reste encore beaucoup de chemin à parcourir avant que l'ulcère de Buruli puisse être contrôlé efficacement. Il s'agit d'une maladie très négligée et la sensibilisation tant au niveau des pays qu'au niveau des communautés doit se poursuivre.

De nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de la mise en œuvre des différentes études. Au lancement de ce projet, au vu de la littérature, nous n'imaginions pas que nous allions être confrontés à de si nombreuses difficultés techniques. Mais, la collaboration, avec les équipes ATIP/Avenir UMR Inserm 1232- CRCINA - Nantes Angers, du Laboratoire ESO (Espaces et Sociétés) Angers, UMR6590 CNRS ESO Angers, du Centre de Diagnostic et de Traitement de la Lèpre et de l'Ulcère de Buruli, CDTLUB, Fondation Raoul Follereau, Pobè et du CIFRED (Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable), Université d'Abomey Calavi, Cotonou, nous a permis de faire progresser ce projet.

A l'issue de notre travail bibliographique, expérimental et du terrain, nous avons pu développer l'outil de prévention primaire ci-dessous.

Il serait judicieux de tester l'outil sur une cohorte plus large de sujets dans d'autres zones endémiques d'Afrique avec la prise en compte des pratiques hydroagricoles dans les zones de bas-fonds, la sociologie et l'hérédité génétique de l'UB afin de valider à grande échelle les résultats encourageants obtenus dans les départements de l'Ouémé et du Plateau au Sud du Bénin.

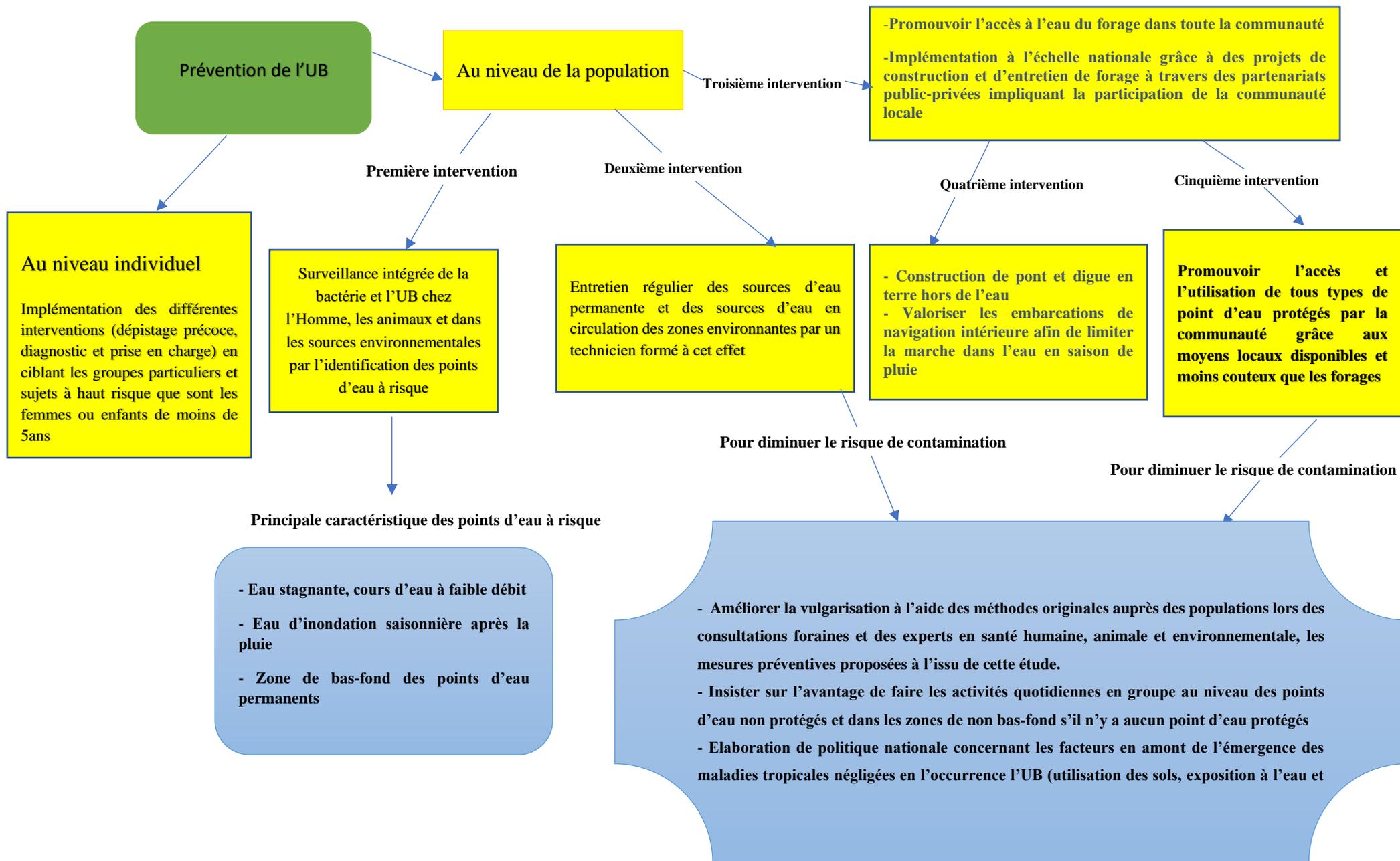


Figure 10 : Modèle de prévention primaire de l'ulcère de Buruli

## Conclusion

L'ulcère de Buruli, une infection à *Mu*, est la troisième mycobactériose mondiale. Cette pathologie, identifiée en 1897 connaît une diminution considérable ces deux dernières décennies dans le monde en l'occurrence en Afrique à l'exception de l'Australie.

Bien que l'infection précoce puisse être traitée par des antibiotiques, une stratégie préventive efficace est difficile à mettre en place en raison de la méconnaissance exacte de tous les réservoirs de la bactérie et de(s) mode(s) exact(s) de transmission.

La formulation d'une stratégie de prévention primaire appropriée et efficace nécessiterait d'une part l'identification précise de ce qui rend un écosystème aquatique favorable à *Mu*, et d'autre part, des comportements et pratiques liés à l'eau qui sont des facteurs de risque ou des facteurs protecteurs. Afin de comprendre comment *Mu* circule dans l'environnement et quels sont les facteurs humains et environnementaux qui influencent cette circulation, l'accès à une large cohorte de patients associé à des données de qualité et exhaustives est nécessaire. Grâce à notre accès à la plus grande cohorte mondiale de patients atteints « d'ulcère de Buruli » confirmés par PCR au CDTLUB-Pobè, les résultats de ces différentes études ont permis de révéler les principales caractéristiques des sources d'eau spécifiques non protégées utilisées par les habitants de cette région du Bénin ainsi que les risques et les facteurs de protection de la contamination par *Mu*.

Grâce à une approche dans la lutte contre l'ulcère de Buruli, impliquant plusieurs disciplines (médecine, épidémiologie, microbiologie, analyse spatiale et géographie de la santé) dans la mise en œuvre, nous avons pu démontrer le rôle prédominant des surfaces d'eau inondées de façon saisonnière, et pas seulement des points d'eau permanents liés au fleuve et à la rivière. Cette étude a permis d'identifier les comportements et les pratiques territoriales les plus liés à l'exposition au *Mu* dans différents contextes environnementaux aquatiques et suggèrent différents modes de gestion communautaire à l'échelle locale du village.

Il ressort de nos travaux que l'incidence de l'ulcère de Buruli est positivement corrélée avec la saisonnalité élevée de l'eau de surface. Les arrondissements à forte saisonnalité ont ainsi un nombre élevé de nouveaux cas alors que ceux sans saisonnalité avec des points d'eau permanents ont un nombre faible de cas même s'ils sont traversés par le fleuve Ouémé.

Les résultats de cette étude seront d'une très grande utilité pour la prévention primaire de l'UB car la prise en charge des patients est souvent complexe dans les zones où cette maladie est endémique et sévère, en particulier dans les zones rurales d'Afrique de l'Ouest et du Centre.

Les maladies tropicales négligées touchent plus d'un milliard de personnes parmi les plus pauvres du monde et ces populations n'ont souvent pas facilement accès à des sources d'eau protégées. Cette situation entretient un cercle vicieux de pauvreté et de maladie, dans un contexte où il a déjà été établi que l'accès à l'eau protégée est crucial pour la prévention et la prise en charge de nombreuses maladies tropicales négligées.

Certes, de nombreuses lacunes demeurent dans les connaissances, notamment en ce qui concerne la transmission et les facteurs de risque. En outre, l'engagement communautaire et l'intégration des guérisseurs traditionnels dans la prise en charge des patients sont des étapes clés vers des programmes de santé publique plus solides. Il est également nécessaire de développer davantage de projets de recherche pour améliorer la prévention et la détection de l'ulcère de Buruli, le traitement des plaies et le soutien psychologique apporté aux patients.

Les résultats issus de nos différentes études et approches pluridisciplinaires soulignent la nécessité de développer une approche intégrée pour lutter contre l'UB dans un cadre unique « One Health Initiative - One World One Medicine One Health » répondant ainsi aux priorités de l'OMS, afin de rendre la prise en charge des patients et la prévention des maladies tropicales négligées plus efficaces dans les populations exposées.

Nous soutenons qu'une approche « One Health » est nécessaire pour faire progresser la compréhension de la transmission de *Mu* et concevoir des scénarios de gestion qui préviennent et répondent aux épidémies des maladies tropicales négligées.

En conclusion, l'effort coordonné mis en avant par le modèle du consortium a permis une avancée substantielle dans la recherche et le contrôle de l'UB.

Alors que les grandes organisations philanthropiques sont plus enclines à s'attaquer aux grands problèmes de société, nous pensons que les petites fondations sont bien placées pour s'attaquer aux problèmes de "niche" qui ne sont pas abordés autrement, mais où elles peuvent avoir un impact important, si elles sont bien gérées et avec les bons partenaires en place.

## Bibliographie

1. Johnson PD, Stinear T, Pamela L, Pluschke G, Merritt RW, Portaels F, et al. Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS medicine*. 2005;2(4):e108.
2. Degnonvi H, Fleuret S, Coudereau C, Gnimavo R, Giffon S, Yeramian E, et al. Effect of well drilling on Buruli ulcer incidence in Benin: a case-control, quantitative survey. *The Lancet Planetary Health*. 2019;3(8):e349-e56.
3. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, Le Gall P, et al. Geographic expansion of Buruli ulcer disease, Cameroon. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(3):551.
4. Barker D. The distribution of Buruli disease in Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1972;66(6):867-74.
5. Group TUBJTotRSotM, Hygiene. Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda. 1971;65(6):763-75.
6. Maman I, Tchacondo T, Kere AB, Piten E, Beissner M, Kobara Y, et al. Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli Ulcer) in Togo— a case-control study in Zio and Yoto districts of the maritime region. 2018;18(1):1-11.
7. Aboagye SY, Asare P, Otchere ID, Koka E, Mensah GE, Yirenya-Tawiah D, et al. Environmental and behavioral drivers of Buruli ulcer disease in selected communities along the Densu River basin of Ghana: a case-control study. 2017;96(5):1076-83.
8. Kenu E, Nyarko KM, Seefeld L, Ganu V, Käser M, Lartey M, et al. Risk factors for Buruli ulcer in Ghana— a case control study in the Suhum-Kraboia-Coaltar and Akuapem South Districts of the eastern region. 2014;8(11):e3279.
9. Aiga H, Amano T, Cairncross S, Domako JA, Nanas O-K, Coleman SJTajotm, et al. Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. 2004;71(4):387-92.
10. Wagner T, Benbow ME, Burns M, Johnson RC, Merritt RW, Qi J, et al. A landscape-based model for predicting *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer disease) presence in Benin, West Africa. 2008;5(1):69-79.
11. Wagner T, Benbow ME, Brenden TO, Qi J, Johnson RCJljohg. Buruli ulcer disease prevalence in Benin, West Africa: associations with land use/cover and the identification of disease clusters. 2008;7(1):1-13.
12. Tabah EN, Johnson CR, Degnonvi H, Pluschke G, Röltgen K. Buruli Ulcer in Africa. *Buruli Ulcer*: Springer; 2019. p. 43-60.
13. O'Brien DP, Jeanne I, Blasdel K, Avumegah M, Athan EJE, *Infection*. The changing epidemiology worldwide of *Mycobacterium ulcerans*. 2019;147.
14. Vandelannoote K, Meehan CJ, Eddyani M, Affolabi D, Phanzu DM, Eyangoh S, et al. Multiple introductions and recent spread of the emerging human pathogen *Mycobacterium ulcerans* across Africa. 2017;9(3):414-26.
15. Vincent QB, Ardant M-F, Adeye A, Goundote A, Saint-André J-P, Cottin J, et al. Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study. 2014;2(7):e422-e30.
16. (WHO) WHO. Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection) 2021 [cited 2021 June 14th]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-\(mycobacterium-ulcerans-infection\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-(mycobacterium-ulcerans-infection)).
17. Sopoh GE, Johnson RC, Chauty A, Dossou AD, Aguiar J, Salmon O, et al. Buruli ulcer surveillance, Benin, 2003–2005. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(9):1374.
18. Cook A. The Mengo Hospital notes for the year 1897. Makerere College Medical School Library, Kampala, Uganda. 1897.
19. MacCallum P, Tolhurst JC, Buckle G, Sissons H. A new mycobacterial infection in man. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1948;60(1):93-122.
20. Parson W. *Mycobacterium ulcerans*. *The Lancet*. 1999;354(9196):2171.
21. Janssens P, Quertinmont M, SIENIAWSKI Jt, Gatti F. Necrotic tropical ulcers and mycobacterial causative agents. *Tropical and geographical medicine*. 1959;11(4):293-312.

22. Clancey J, Dodge R, Lunn H. Study of a mycobacterium causing skin ulceration in Uganda. *Ann Soc Belg Méd Trop.* 1962;4:585-90.
23. Clancey J, Dodge O, Lunn H, Oduori M. Mycobacterial skin ulcers in Uganda. *Lancet.* 1961:951-4.
24. Lunn H, Connor D, Wilks N, Barnley G, Kamunvi F, Clancey J, et al. Buruli (Mycobacterial) Ulceration in Uganda. (A New Focus of Buruli Ulcer in Madi District, Uganda.). *East African Medical Journal.* 1965;42(6):275-88.
25. Buruli ulcer epidemiological situation [Internet]. 2019 [cited 26, 2019 July]. Available from: [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-\(mycobacterium-ulcerans-infection\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-(mycobacterium-ulcerans-infection)).
26. Ayelo GA, Anagonou E, Wadagni AC, Barogui YT, Dossou AD, Houezo JG, et al. Report of a series of 82 cases of Buruli ulcer from Nigeria treated in Benin, from 2006 to 2016. 2018;12(3):e0006358.
27. Sopoh G, Asiedu K. Buruli Ulcer in Sub-Saharan Africa. *Neglected Tropical Diseases-Sub-Saharan Africa*: Springer; 2016. p. 15-43.
28. Smith JH. Epidemiologic observations on cases of Buruli ulcer seen in a hospital in the Lower Congo. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1970;19(4):657-63.
29. Oluwasanmi J, Solanke T, Olurin E, Itayemi S, Alabi G, Lucas A. Mycobacterium ulcerans (Buruli) skin ulceration in Nigeria. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1976;25(1):122-8.
30. Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh Jr CR, Diomande I, Saki MZ, Kanga J-M, et al. Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1995;52(3):219-24.
31. Darie H, Le TG, Touze J. Epidemiological and clinical aspects of Buruli ulcer in Ivory Coast. 124 recent cases. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990).* 1993;86(4):272-6.
32. Burchard G, Bierther M. Buruli ulcer: clinical pathological study of 23 patients in Lambarene, Gabon. *Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ).* 1986;37(1):1-8.
33. Röltgen K, Pluschke G. Epidemiology and disease burden of Buruli ulcer: a review. *Research and Reports in Tropical Medicine.* 2015;6:59.
34. Organization WH. Updated Buruli ulcer recording and reporting forms are now available 2020 [cited 2021 03/15]. Available from: Updated Buruli ulcer recording and reporting forms are now available.
35. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Guédénon A, et al. Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) in rural hospital, Southern Benin, 1997–2001. *Emerging infectious diseases.* 2004;10(8):1391.
36. Aujoulat I, Johnson C, Zinsou C, Guédénon A, Portaels F. Psychosocial aspects of health seeking behaviours of patients with Buruli ulcer in southern Benin. *Tropical Medicine & International Health.* 2003;8(8):750-9.
37. Johnson R, Sopoh G, Boko M, Zinsou C, Gbovi J, Makoutode M, et al. Distribution of Mycobacterium ulcerans (Buruli ulcer) in the district of Lalo in Benin. *Tropical medicine & international health: TM & IH.* 2005;10(9):863-71.
38. Yotsu RR, Suzuki K, Simmonds RE, Bedimo R, Ablordey A, Yeboah-Manu D, et al. Buruli Ulcer: a Review of the Current Knowledge. *Current Tropical Medicine Reports.* 2018;5(4):247-56.
39. Ablordey A, Kotlowski R, Swings J, Portaels FJJocm. PCR amplification with primers based on IS 2404 and GC-rich repeated sequence reveals polymorphism in Mycobacterium ulcerans. 2005;43(1):448-51.
40. Josse R, Guedenon A, Darie H, Anagonou S, Portaels F, Meyers W. Mycobacterium ulcerans cutaneous infections: Buruli ulcers. *Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial.* 1995;55(4):363-73.
41. Connor DH, Lunn H. Mycobacterium ulcerans infection (with comments on pathogenesis). *ARMED FORCES INST OF PATHOLOGY WASHINGTON DC*; 1965.
42. Krieg RE, Hockmeyer WT, Connor DH. Toxin of Mycobacterium ulcerans: production and effects in guinea pig skin. *Archives of dermatology.* 1974;110(5):783-8.
43. Read JK, Heggie CM, Meyers WM, Connor DH. Cytotoxic activity of Mycobacterium ulcerans. *Infection and immunity.* 1974;9(6):1114-22.

44. George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, et al. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science*. 1999;283(5403):854-7.
45. Benowitz AB, Fidanze S, Small P, Kishi Y. Stereochemistry of the core structure of the mycolactones. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(21):5128-9.
46. Fidanze S, Song F, Szlosek-Pinaud M, Small P, Kishi Y. Complete structure of the mycolactones. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(41):10117-8.
47. Doig KD, Holt KE, Fyfe JA, Lavender CJ, Eddyani M, Portaels F, et al. On the origin of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *BMC genomics*. 2012;13(1):258.
48. Chany AC, Casarotto V, Schmitt M, Tarnus C, Guenin-Macé L, Demangel C, et al. A diverted total synthesis of mycolactone analogues: an insight into Buruli ulcer toxins. *Chemistry—A European Journal*. 2011;17(51):14413-9.
49. Scherr N, Gersbach P, Dangy J-P, Bomio C, Li J, Altmann K-H, et al. Structure-activity relationship studies on the macrolide exotoxin mycolactone of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(3):e2143.
50. Guenin-Macé L, Baron L, Chany A-C, Tresse C, Saint-Auret S, Jönsson F, et al. Shaping mycolactone for therapeutic use against inflammatory disorders. *Science translational medicine*. 2015;7(289):289ra85-ra85.
51. Gehringer M, Altmann K-H. The chemistry and biology of mycolactones. *Beilstein journal of organic chemistry*. 2017;13(1):1596-660.
52. Saint-Auret S, Chany A-C, Casarotto V, Tresse C, Parmentier L, Abdelkafi H, et al. Total Syntheses of Mycolactone A/B and its Analogues for the Exploration of the Biology of Buruli Ulcer. *Chimia*. 2017;71(12):836-40.
53. Merritt RW, Walker ED, Small PL, Wallace JR, Johnson PD, Benbow ME, et al. Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. 2010;4(12):e911.
54. Röltgen K, Pluschke GJCCMR. *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): potential reservoirs and vectors. 2015;2(1):35-43.
55. Brou T, Broutin H, Elguero E, Asse H, Guegan J-F. Landscape diversity related to Buruli ulcer disease in Cote d'Ivoire. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(7):e271.
56. Carolan K, Garchitorena A, García-Peña GE, Morris A, Landier J, Fontanet A, et al. Topography and land cover of watersheds predicts the distribution of the environmental pathogen *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(11):e3298.
57. Aiga H, Amano T, Cairncross S, Domako JA, Nanas O-K, Coleman S. Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(4):387-92.
58. Debacker M, Portaels F, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers W, et al. Risk factors for Buruli ulcer, Benin. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(9):1325.
59. Nackers F, Johnson RC, Glynn JR, Zinsou C, Tonglet R, Portaels FJTAjotm, et al. Environmental and health-related risk factors for *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in Benin. 2007;77(5):834-6.
60. Pouillot R, Matias G, Wondje CM, Portaels F, Valin N, Ngos F, et al. Risk factors for Buruli ulcer: a case control study in Cameroon. *PLoS neglected tropical diseases*. 2007;1(3):e101.
61. Darie H. Infection par *Mycobacterium ulcerans*. *Bull Soc Pathol Exot*. 2003;96(5):368-71.
62. Portaels F. *Mycobacteria* and tropical regions: from the environment to man. *Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial*. 2004;64(3):219-20.
63. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne P-A, Meyers WM. Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *The Lancet*. 1999;353(9157):986.
64. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint André J-P, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(9):4623-8.
65. Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, André JPS, Small PL, Milon G, et al. Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. 2005;7(7):935-43.

66. Marsollier L, André JPS, Frigui W, Reyssat G, Milon G, Carbonnelle B, et al. Early trafficking events of *Mycobacterium ulcerans* within *Naucoris cimicoides*. *Cellular microbiology*. 2007;9(2):347-55.
67. Marsollier L, Aubry J, Milon G, Brodin P. Punaises aquatiques et transmission de *Mycobacterium ulcerans*. *médecine/sciences*. 2007;23(6-7):572-5.
68. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS pathogens*. 2007;3(5):e62.
69. Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, Beachboard DC, Kimbirauskas RK, McIntosh MD, et al. Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(3):e205.
70. Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, De Weirdt D, Boakye D, Meyers WM, et al. Potential role for fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): an environmental study. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(9):5679-81.
71. Kotlowski R, Martin A, Ablordey A, Chemlal K, Fonteyne P-A, Portaels F. One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish. *Journal of medical microbiology*. 2004;53(9):927-33.
72. Marsollier L, Séverin T, Aubry J, Merritt RW, Saint André J-P, Legras P, et al. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(10):6296-8.
73. Barker D. Buruli disease in a district of Uganda. *Journal of tropical medicine and hygiene*. 1971;74(12):260-64.
74. Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint André JP, Robert R, Legras P, et al. Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(2):1097-103.
75. Mosi L, Williamson H, Wallace JR, Merritt RW, Small P. Persistent association of *Mycobacterium ulcerans* with West African predaceous insects of the family belostomatidae. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(22):7036-42.
76. Benbow ME, Williamson H, Kimbirauskas R, McIntosh MD, Kolar R, Quaye C, et al. Aquatic invertebrates as unlikely vectors of Buruli ulcer disease. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(8):1247.
77. Marion E, Deshayes C, Chauty A, Cassisa V, Tchibozo S, Cottin J, et al. Détection des signatures moléculaires de *Mycobacterium ulcerans* chez des punaises aquatiques capturées au Bénin en dehors de leur environnement aquatique. *Médecine tropicale*. 2011;71(2):169-72.
78. Revill W, Morrow R, Parson W, Kiryabwire J. *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). *Medicine in a tropical environment* London: British Medical Association. 1972:19-31.
79. Durnez L, Suykerbuyk P, Nicolas V, Barriere P, Verheyen E, Johnson CR, et al. Terrestrial small mammals as reservoirs of *Mycobacterium ulcerans* in benin. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(13):4574-7.
80. Elsner L, Wayne J, O'Brien CR, McCowan C, Malik R, Hayman JA, et al. Localised *Mycobacterium ulcerans* infection in a cat in Australia. *Journal of feline medicine and surgery*. 2008;10(4):407-12.
81. Van Zyl A, Daniel J, Wayne J, McCowan C, Malik R, Jelfs P, et al. *Mycobacterium ulcerans* infections in two horses in south-eastern Australia. *Australian veterinary journal*. 2010;88(3):101-6.
82. O'Brien C, McMillan E, Harris O, O'Brien D, Lavender C, Globan M, et al. Localised *Mycobacterium ulcerans* infection in four dogs. *Australian veterinary journal*. 2011;89(12):506-10.
83. Fyfe JA, Lavender CJ, Handasyde KA, Legione AR, O'Brien CR, Stinear TP, et al. A major role for mammals in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(8):e791.
84. Tabah EN, Johnson CR, Degnonvi H, Pluschke G, Röltgen K. Buruli Ulcer in Africa. In: Pluschke G, Röltgen K, editors. *Buruli Ulcer: Mycobacterium Ulcerans Disease*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 43-60.
85. Johnson PD, Azuolas J, Lavender CJ, Wishart E, Stinear TP, Hayman JA, et al. *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(11):1653.

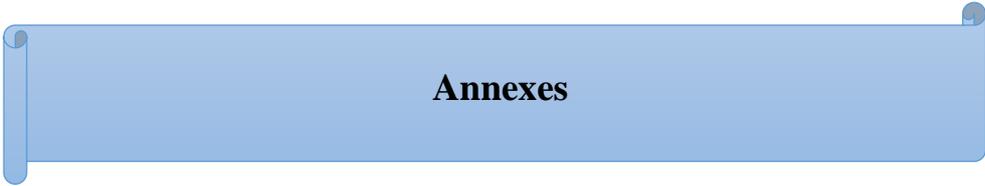
86. Tobias NJ, Seemann T, Pidot SJ, Porter JL, Marsollier L, Marion E, et al. Mycolactone gene expression is controlled by strong SigA-like promoters with utility in studies of *Mycobacterium ulcerans* and buruli ulcer. *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(11):e553.
87. Wallace JR, Gordon MC, Hartsell L, Mosi L, Benbow ME, Merritt RW, et al. Interaction of *Mycobacterium ulcerans* with mosquito species: implications for transmission and trophic relationships. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(18):6215-22.
88. Debacker M, Zinsou C, Aguiar J, Meyers WM, Portaels F. First case of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) following a human bite. *Clinical infectious diseases*. 2003;36(5):e67-e8.
89. Wansbrough-Jones M, Phillips R. Buruli ulcer: emerging from obscurity. *The Lancet*. 2006;367(9525):1849-58.
90. Merritt RW, Walker ED, Small PL, Wallace JR, Johnson PD, Benbow ME, et al. Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(12):e911.
91. Loftus MJ, Trubiano JA, Tay EL, Lavender CJ, Globan M, Fyfe JA, et al. The incubation period of Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection) in Victoria, Australia—Remains similar despite changing geographic distribution of disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(3):e0006323.
92. Trubiano JA, Lavender CJ, Fyfe JA, Bittmann S, Johnson PD. The incubation period of Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection). *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(10):e2463.
93. Steffen CM, Freeborn H. *Mycobacterium ulcerans* in the Daintree 2009–2015 and the mini-epidemic of 2011. *ANZ journal of surgery*. 2018;88(4):E289-E93.
94. Group TUB. Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1971;65(6):763-75.
95. Yotsu RR, Nakanaga K, Hoshino Y, Suzuki K, Ishii N. Buruli ulcer and current situation in Japan: a new emerging cutaneous *Mycobacterium* infection. *The Journal of dermatology*. 2012;39(7):587-93.
96. Landier J, De Magny GC, Garchitorena A, Guégan J-F, Gaudart J, Marsollier L, et al. Seasonal patterns of Buruli ulcer incidence, Central Africa, 2002–2012. 2015;21(8):1414.
97. Darie H, Le Guyadec T, Touze JJBdISdpe. Aspects épidémiologiques et cliniques de l'ulcère de Buruli en Côte-d'Ivoire: à propos de 124 observations récentes. 1993;86(4):272-6.
98. N'krumah RT, Kone B, Tiembre I, Cisse G, Pluschke G, Tanner M, et al. Socio-environmental factors associated with the risk of contracting Buruli ulcer in Tiassalé, South Côte d'Ivoire: A case-control study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(1):e0004327.
99. Maman I, Tchacondo T, Kere AB, Piten E, Beissner M, Kobara Y, et al. Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli Ulcer) in Togo— a case-control study in Zio and Yoto districts of the maritime region. *BMC infectious diseases*. 2018;18(1):48.
100. N'krumah RT, Koné B, Tiembre I, Cissé G, Pluschke G, Tanner M, et al. Socio-environmental factors associated with the risk of contracting Buruli ulcer in Tiassalé, South Côte d'Ivoire: A case-control study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(1):e0004327.
101. Sopoh GE, Barogui YT, Johnson RC, Dossou AD, Makoutodé M, Anagonou SY, et al. Family relationship, water contact and occurrence of Buruli ulcer in Benin. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(7):e746.
102. Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoah K, Stienstra Y, Taylor Jr TH, Amofah GK, et al. Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* infection): results from a case-control study in Ghana. 2005;40(10):1445-53.
103. Quek TY, Athan E, Henry MJ, Pasco JA, Redden-Hoare J, Hughes A, et al. Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection, southeastern Australia. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(11):1661.
104. Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoah K, Stienstra Y, Taylor Jr TH, Amofah GK, et al. Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* infection): results from a case-control study in Ghana. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(10):1445-53.
105. Centre René Labusquière IdMT, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux (France). Ulcère de Buruli, Actualités 2018 2018 [updated 26/10/2018Juillet 2019]. Available from: <http://medecinetropicale.free.fr/enseignement.html>.

106. Johnson RC, Nackers F, Glynn JR, de Biurrun Bakedano E, Zinsou C, Aguiar J, et al. Association of HIV infection and Mycobacterium ulcerans disease in Benin. *Aids*. 2008;22(7):901-3.
107. Tuffour J, Owusu-Mireku E, Ruf M-T, Aboagye S, Kpeli G, Akuoku V, et al. Challenges associated with management of Buruli ulcer/human immunodeficiency virus coinfection in a treatment center in Ghana: a case series study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(2):216-23.
108. Christinet V, Comte E, Ciaffi L, Odermatt P, Serafini M, Antierens A, et al., editors. Impact of human immunodeficiency virus on the severity of buruli ulcer disease: results of a retrospective study in cameroon. *Open forum infectious diseases*; 2014: Oxford University Press.
109. Komenan K, Elidjé EJ, Ildevert GP, Yao KI, Kanga K, Kouamé KA, et al. Multifocal Buruli ulcer associated with secondary infection in HIV positive patient. *Case reports in medicine*. 2013;2013.
110. Bayonne LM, Portaels F, Eddyani M, Book A, Vandellanootte K. Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) in Gabon: 2005-2011. *Medecine et sante tropicales*. 2013;23(4):450-7.
111. Kibadi K, Colebunders R, Muyembe-Tamfum J-J, Meyers WM, Portaels F. Buruli ulcer lesions in HIV-positive patient. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(4):738.
112. Toll A, Gallardo F, Ferran M, Gilaberte M, Iglesias M, Gimeno J, et al. Aggressive multifocal Buruli ulcer with associated osteomyelitis in an HIV-positive patient. *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology*. 2005;30(6):649-51.
113. Johnson RC, Ifebe D, Hans-Moevi A, Kestens L, Houessou R, Guédénon A, et al. Disseminated Mycobacterium ulcerans disease in an HIV-positive patient: a case study. *AIDS*. 2002;16(12):1704-5.
114. Bafende A, Lukanu N, Numbi A. Buruli ulcer in an AIDS patient. *South African Medical Journal*. 2002;92(6):437.
115. O'Brien DP, Ford N, Vitoria M, Christinet V, Comte E, Calmy A, et al. Management of BU–HIV co-infection. *Tropical Medicine & International Health*. 2014;19(9):1040-7.
116. Amoussouhoui AS, Sopoh GE, Wadagni AC, Johnson RC, Aoulou P, Agbo IE, et al. Implementation of a decentralized community-based treatment program to improve the management of Buruli ulcer in the Ouinhi district of Benin, West Africa. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(3):e0006291.
117. Mulder AA, Boerma RP, Barogui Y, Zinsou C, Johnson RC, Gbovi J, et al. Healthcare seeking behaviour for Buruli ulcer in Benin: a model to capture therapy choice of patients and healthy community members. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(9):912-20.
118. Renzaho AM, Woods PV, Ackumey MM, Harvey SK, Kotin J. Community-based study on knowledge, attitude and practice on the mode of transmission, prevention and treatment of the Buruli ulcer in Ga West District, Ghana. *Tropical Medicine & International Health*. 2007;12(3):445-58.
119. Koka E, Yeboah-Manu D, Okyere D, Adongo PB, Ahorlu CK. Cultural understanding of wounds, Buruli ulcers and their management at the Obom sub-district of the Ga south municipality of the Greater Accra region of Ghana. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(7):e0004825.
120. Grietens KP, Boock AU, Peeters H, Hausmann-Muela S, Toomer E, Ribera JM. Correction: "It Is Me Who Endures but My Family That Suffers": Social Isolation as a Consequence of the Household Cost Burden of Buruli Ulcer Free of Charge Hospital Treatment. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(11).
121. Amoakoh HB, Aikins M. Household cost of out-patient treatment of Buruli ulcer in Ghana: a case study of Obom in Ga South Municipality. *BMC health services research*. 2013;13(1):507.
122. Chukwu JN, Meka AO, Nwafor CC, Oshi DC, Madichie NO, Ekeke N, et al. Financial burden of health care for Buruli ulcer patients in Nigeria: the patients' perspective. *International health*. 2017;9(1):36-43.
123. Sopoh GE, Johnson RC, Chauty A, Dossou AD, Aguiar J, Salmon O, et al. Buruli ulcer surveillance, Benin, 2003–2005. 2007;13(9):1374.
124. Mitjà O, Lukehart SA, Pokowas G, Moses P, Kapa A, Godornes C, et al. Haemophilus ducreyi as a cause of skin ulcers in children from a yaws-endemic area of Papua New Guinea: a prospective cohort study. *The Lancet Global Health*. 2014;2(4):e235-e41.
125. Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portaels F. Mycobacterium ulcerans infection: control, diagnosis, and treatment. *The Lancet infectious diseases*. 2006;6(5):288-96.

126. Portaels F, Johnson P, Meyers WM, Organization WH, Initiative GBU. Buruli ulcer: diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease: a manual for health care providers. Geneva: World Health Organization; 2001.
127. Cassisa V, Chauty A, Marion E, Ardant MF, Eyangoh S, Cottin J, et al. Use of fine-needle aspiration for diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(6):2263-4.
128. Eddyani M, Fraga AG, Schmitt F, Uwizeye C, Fissette K, Johnson C, et al. Fine-needle aspiration, an efficient sampling technique for bacteriological diagnosis of nonulcerative Buruli ulcer. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(6):1700-4.
129. Njiru ZK, Yeboah-Manu D, Stinear TP, Fyfe JA. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium ulcerans* by use of a loop-mediated isothermal amplification test. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(5):1737-41.
130. Ablordey A, Amisah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(4):e1590.
131. Wansbrough-Jones M, Phillips RJTL. Buruli ulcer: emerging from obscurity. 2006;367(9525):1849-58.
132. Silva MT, Portaels F, Pedrosa J. Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite *Mycobacterium ulcerans* leading to Buruli ulcer. *The Lancet infectious diseases*. 2009;9(11):699-710.
133. Asiedu K, Raviglione MC, Scherpbier R, Organization WH, Initiative GBU. Buruli ulcer: *Mycobacterium ulcerans* infection. Geneva: World Health Organization; 2000.
134. Stienstra Y, van Roest MH, van Wezel MJ, Wiersma IC, Hospers IC, Dijkstra PU, et al. Factors associated with functional limitations and subsequent employment or schooling in Buruli ulcer patients. *Tropical Medicine & International Health*. 2005;10(12):1251-7.
135. Stienstra Y, Dijkstra PU, Van Wezel MJ, Van Roest MH, Beets M, Zijlstra I, et al. Reliability and validity of the Buruli ulcer functional limitation score questionnaire. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;72(4):449-52.
136. Stienstra Y, van der Graaf WT, Asamoah K, van der Werf TS. Beliefs and attitudes toward Buruli ulcer in Ghana. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;67(2):207-13.
137. Trelu LT, Nkemenang P, Bastard M, Ehounou G, Eyangoh S, Mboua B, et al. *Diagnostiques différentiels de l'ulcère de Buruli: données d'Akonolinga, Cameroun*. 2014.
138. Van der Werf TS, Van der Graaf WT, Tappero JW, Asiedu K. *Mycobacterium ulcerans* infection. *The Lancet*. 1999;354(9183):1013-8.
139. Revill W, Morrow R, Pike M, Ateng J. A controlled trial of the treatment of *Mycobacterium ulcerans* infection with clofazimine. *The Lancet*. 1973;302(7834):873-7.
140. Espey DK, Djomand G, Diomande I, Dosso M, Saki MZ, Kanga J-M, et al. Pilot study of treatment of Buruli ulcer with rifampin and dapson. *International journal of infectious diseases*. 2002;6(1):60-5.
141. Fehr H, Egger M, Senn I. Cotrimoxazol in the treatment of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) in west Africa. *Tropical doctor*. 1994;24(2):61-3.
142. Etuaful S, Carbonnelle B, Grosset J, Lucas S, Horsfield C, Phillips R, et al. Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(8):3182-6.
143. Chauty A, Ardant M-F, Adeye A, Euverte H, Guédénon A, Johnson C, et al. Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(11):4029-35.
144. Chauty A, Ardant M-F, Marsollier L, Pluschke G, Landier J, Adeye A, et al. Oral treatment for *Mycobacterium ulcerans* infection: results from a pilot study in Benin. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(1):94-6.
145. Organization WH. *Treatment of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer): guidance for health workers*. 2012.
146. Klis S, Stienstra Y, Phillips RO, Abass KM, Tuah W, van der Werf TSJPNTD. Long term streptomycin toxicity in the treatment of Buruli ulcer: follow-up of participants in the BURULICO drug trial. 2014;8(3):e2739.

147. Owusu AY. The socioeconomic burden of Buruli ulcer disease in the GA West District of Ghana. *Ghana Journal of Development Studies*. 2012;9(1):5-20.
148. Schütte D, Pluschke G. Immunosuppression and treatment-associated inflammatory response in patients with *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). *Expert opinion on biological therapy*. 2009;9(2):187-200.
149. O'Brien DP, Robson ME, Callan PP, McDonald AH. " Paradoxical" immune-mediated reactions to *Mycobacterium ulcerans* during antibiotic treatment: a result of treatment success, not failure. 2009.
150. Asiedu K, Wansbrough-Jones M. *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli or Bairnsdale ulcer): challenges in developing management strategies. *Medical journal of Australia*. 2007;186(2):55.
151. Amissah NA, Glasner C, Ablordey A, Tetteh CS, Kotey NK, Prah I, et al. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* in Buruli ulcer. 2015;9(2):e0003421.
152. OMS. Traitement de l'infection à *mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli): recommandations à l'intention des agents de santé. 2012.
153. Beissner M, Symanck D, Phillips RO, Amoako YA, Awua-Boateng N-Y, Sarfo FS, et al. Detection of Viable *Mycobacterium ulcerans* in Clinical Samples by a Novel Combined 16S rRNA Reverse Transcriptase/IS 2404 Real-Time qPCR Assay. 2012;6(8):e1756.
154. Torrado E, Fraga AG, Logarinho E, Martins TG, Carmona JA, Gama JB, et al. IFN- $\gamma$ -dependent activation of macrophages during experimental infections by *Mycobacterium ulcerans* is impaired by the toxin mycolactone. *The journal of immunology*. 2010;184(2):947-55.
155. Hong H, Demangel C, Pidot SJ, Leadlay PF, Stinear T. Mycolactones: immunosuppressive and cytotoxic polyketides produced by aquatic mycobacteria. *Natural product reports*. 2008;25(3):447-54.
156. Nackers F, Dramaix M, Johnson RC, Zinsou C, Robert A, Bakedano EDB, et al. BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer: a case-control study in Benin. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(4):768-74.
157. Gooding TM, Johnson PD, Smith M, Kemp AS, Robins-Browne RMJI, immunity. Cytokine profiles of patients infected with *Mycobacterium ulcerans* and unaffected household contacts. 2002;70(10):5562-7.
158. Vincent QB, Ardant M-F, Adeye A, Goundote A, Saint-André J-P, Cottin J, et al. Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study. *The Lancet Global Health*. 2014;2(7):e422-e30.
159. Marion E, Chauty A, Kempf M, Le Corre Y, Delneste Y, Croue A, et al., editors. Clinical features of spontaneous partial healing during *Mycobacterium ulcerans* infection. *Open forum infectious diseases*; 2016: Oxford University Press.
160. Zogo B, Djenontin A, Carolan K, Babonneau J, Guegan J-F, Eyangoh S, et al. A field study in Benin to investigate the role of mosquitoes and other flying insects in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*. 2015;9(7):e0003941.
161. Marion E, Chauty A, Yeramian E, Babonneau J, Kempf M, Marsollier L. A case of guilt by association: water bug bite incriminated in *M. ulcerans* infection. 2014;3(2):158-61.
162. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, Aubry J, et al. Seasonal and regional dynamics of *M. ulcerans* transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors. 2010;4(7):e731.
163. Marsollier L, Aubry J, Saint-André J-P, Robert R, Legras P, Manceau A-L, et al. Ecologie et mode de transmission de *Mycobacterium ulcerans*. *Pathologie Biologie*. 2003;51(8-9):490-5.
164. (INSAE) INdSedIAE. Taux d'inflation février 2021 2021 [Available from: <https://insae.bj/statistiques/indicateurs-recents/231-taux-d-inflation-fevrier-2021>].
165. santé Mdl. Statistiques sanitaires 2019 [cited 2019 20 11]. Available from: <https://sante.gouv.bj/>.
166. Dasgupta A, Ghosh P, Paul B, Roy S, Ghose S, Yadav AJJoCM. Factors associated with intention and attempt to quit: A study among current smokers in a rural community of West Bengal. 2021;46(2):216.
167. Johnson RC, Sopoh G, Barogui Y, Dossou A, Fourn L, Zohoun TJS. Surveillance system for Buruli ulcer in Benin: results after four years. 2008;18(1):9-13.

168. Johnson RC, Makoutodé M, Sopoh GE, Elsen P, Gbovi J, Pouteau LH, et al. Buruli ulcer distribution in Benin. 2005.
169. Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, Marot A, Wondje CM, Saint-André J-P, et al. Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. 2007;4(2):e64.
170. Vandelannoote K, Phanzu DM, Kibadi K, Eddyani M, Meehan CJ, Jordaens K, et al. *Mycobacterium ulcerans* population genomics to inform on the spread of Buruli ulcer across central Africa. 2019;4(1).
171. Vandelannoote K, Meehan CJ, Eddyani M, Affolabi D, Phanzu DM, Eyangoh S, et al. Multiple introductions and recent spread of the emerging human pathogen *Mycobacterium ulcerans* across Africa. *Genome biology and evolution*. 2017;9(3):414-26.
172. Buultjens AH, Vandelannoote K, Meehan CJ, Eddyani M, De Jong BC, Fyfe JA, et al. Comparative genomics shows that *Mycobacterium ulcerans* migration and expansion preceded the rise of Buruli ulcer in southeastern Australia. 2018;84(8).
173. Pouillot R, Matias G, Wondje CM, Portaels F, Valin N, Ngos F, et al. Risk factors for Buruli ulcer: a case control study in Cameroon. 2007;1(3):e101.
174. Johnson PD, Veitch MG, Flood PE, Hayman JAJTMjoA. *Mycobacterium ulcerans* infection on Phillip Island, Victoria. 1995;162(4):221-2.
175. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers W, Scott JT, et al. *Mycobacterium ulcerans* disease: role of age and gender in incidence and morbidity. *Tropical Medicine & International Health*. 2004;9(12):1297-304.
176. Tomczyk S, Deribe K, Brooker SJ, Clark H, Rafique K, Knopp S, et al. Association between footwear use and neglected tropical diseases: a systematic review and meta-analysis. 2014;8(11):e3285.
177. Fevereiro J, Sajjadi N, Fraga AG, Teixeira PM, Pedrosa JJPntd. Individual and clinical variables associated with the risk of Buruli ulcer acquisition: A systematic review and meta-analysis. 2020;14(4):e0008161.
178. Kenu E, Nyarko KM, Seefeld L, Ganu V, Käser M, Lartey M, et al. Risk factors for Buruli ulcer in Ghana—a case control study in the Suhum-Krabo-Coaltar and Akuapem South Districts of the eastern region. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(11):e3279.
179. Röltgen K, Pluschke GJR, Medicine RiT. Epidemiology and disease burden of Buruli ulcer: a review. 2015;6:59-73.
180. O'Brien DP, Athan E, Blasdell K, De Barro P. Tackling the worsening epidemic of Buruli ulcer in Australia in an information void: time for an urgent scientific response. *Medical Journal of Australia*. 2018;208(7):287-9.
181. N'krumah RT, Koné B, Tiembre I, Cissé G, Pluschke G, Tanner M, et al. Socio-environmental factors associated with the risk of contracting Buruli ulcer in Tiassalé, South Côte d'Ivoire: A case-control study. 2016;10(1):e0004327.



**Annexes**

## Annexe 1 : Outil de collecte pour l'étude épidémiologique

# GéAnt

1. Date

2. Code Sujet (000-H/F-0/1/2)

3. NOM ET PRENOM DE L'ENQUETEUR

## IDENTITE DU PATIENT/TEMOIN

4. Nom

5. Prénom

6. SEXE

M

F

7. Date de naissance

8-12. Lieu de résidence(département, commune, arrondissement, village, quartier/maison)

8. Département

9. Commune

10. Arrondissement

11. Village

12. Quartier/maison

13. Coordonnées GPS du lieu de résidence

14. Depuis quand vivez-vous dans le village/quartier (nombre d'années)

15. Origine ethnique

16. Confession religieuse

# GéAnt

## 17-24. Profession actuelle

17. Principale

18. Depuis quand? (P1)

19. ET où ? (P1)

20. GPS1

21. Professions secondaires

22. Depuis quand? (P2)

23. Et où ? (P2)

24. GPS2

**25. De combien de personnes se compose votre foyer (en vous incluant)**

**26. Description du foyer**

## **GéAnt**

### **Habitudes de vie**

27. En semaine. Décrivez-nous vos principales activités dans une journée habituelle en précisant les lieux et les heures? *Consigne à l'enquêteur : Tout écrire avec détails pour comprendre son mode de vie. Ne pas oublier les repas, heure de levée, couché, école, mode de transport....*

28. Le week-end. Décrivez-nous vos principales activités dans une journée habituelle en précisant les lieux et les heures? *Consigne à l'enquêteur : Tout écrire avec détails pour comprendre son mode de vie. Ne pas oublier les repas, heure de levée, couché, école, mode de transport....*

## GéAnt

### 29-38. Parmi les activités suivantes lesquelles sont à votre charge pour votre foyer?

	Toujours	Parfois	Jamais	Saisonnier
29. Cuisine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30. Vaisselle	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31. Lessive	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32. Ménage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
33. Aller chercher l'eau	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34. Laver les motos ou véhicules	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35. Faire les achats	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
36. Chasser	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
37. Pêcher	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
38. Potager	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### 39. Précisez pourquoi pour certaines activités sont saisonnières

### 40. Au cours de l'année passée, avez-vous voyagé?

Oui

Non

### 41-44. Si oui,

41. Quand ?

42. Combien de temps ?

43. Où ?

44. Pour quel motif ?

## Usages de l'eau

### 45. Avez-vous un point d'eau dans votre maison ?

Non

Forage

Citerne

Autre

Lavabo

Si 'Autre' précisez :

### 47. Est-ce que vous l'utilisez?

Oui

Non



## **GéAnt**

### 66-73. Pour chacune de ces activités, quelles sont les coordonnées GPS du lieu principal ?

66. Aller chercher de l'eau pour le foyer	<input type="text"/>
67. Se laver à l'extérieur. a l'extérieur signifie, en dehors de la maison, dans une source par ex.	<input type="text"/>
68. Se baigner à l'extérieur	<input type="text"/>
69. Faire la lessive à l'extérieur	<input type="text"/>
70. Faire la vaisselle à l'extérieur	<input type="text"/>
71. Contact avec l'eau lors d'activités professionnelles	<input type="text"/>
72. Pêche loisirs	<input type="text"/>
73. Autres	<input type="text"/>

### 74-81. Pour chacune de ces activités, coordonnées GPS du lieu secondaire ?

74. Aller chercher de l'eau pour le foyer	<input type="text"/>
75. Se laver à l'extérieur. a l'extérieur signifie, en dehors de la maison, dans une source par ex.	<input type="text"/>
76. Se baigner à l'extérieur	<input type="text"/>
77. Faire la lessive à l'extérieur	<input type="text"/>
78. Faire la vaisselle à l'extérieur	<input type="text"/>
79. Contact avec l'eau lors d'activités professionnelles	<input type="text"/>
80. Pêche loisirs	<input type="text"/>
81. Autres	<input type="text"/>

### 82-89. Pour chacune de ces activités, les faites vous ?

	Seul.e	Accompagné.e	La personne qui m'accompagne le plus souvent a contracté l'UB	La personne qui m'accompagne le plus souvent n'a pas contracté l'UB
82. Aller chercher de l'eau pour le foyer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
83. Se laver à l'extérieur. a l'extérieur signifie, en dehors de la maison, dans une source par ex.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
84. Se baigner à l'extérieur	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
85. Faire la lessive à l'extérieur	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
86. Faire la vaisselle à l'extérieur	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
87. Contact avec l'eau lors d'activités professionnelles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
88. Pêche loisirs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
89. Autres	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### 90. Si vous êtes souvent avec quelqu'un, qui-est-ce?

## **GéAnt**

### **91. Commentaire libre de l'enquêteur sur contact avec l'eau :**

*Description des différents sites, aménagement de l'Homme sur les sources. Description des changements lors de la crue.....*

*Changement des habitudes de vie pendant les différentes saisons, les congés.....*

## **Rapport avec la maladie (cas)**

### **92. Vous souvenez-vous de quand et comment sont apparus les premiers symptômes de la maladie ?**

Oui

Non

### **93. Si oui, comment ?**

Plaque

Gonflement

Nodule

Bouton

Oedème

### **94. Racontez-nous :**

### **95. Comment et où pensez-vous avoir attrapé la maladie ? Selon vous, quelle(s) est (sont) les causes de cette maladie ? Racontez-nous ?**

*Consigne à l'enquêteur : si un endroit est mentionné, se rendre sur le lieu, le décrire et prendre GPS. Attention, revenir à la question du voyage du patient. Si la personne a voyagé, pense t-il qu'il pourrait pu contracter l'Ulcère de Buruli à ce moment là ?*

## GéAnt

**96. Durant les semaines précédant l'apparition de la plaie, aviez-vous ressenti des piqûres d'insectes ou de plantes lors de vos activités journalières ?**

*Consigne à l'enquêteur : à la fin du récit, demander la fréquence des piqûres (rare ou fréquent ?)*

- Oui  si oui racontez-nous  
 Non

si oui racontez-nous

**98. Durant les semaines précédant l'apparition de la plaie, aviez-vous eu des blessures, des chocs, des prurits, des coupures lors de vos activités journalières ?**

**99. Lors de l'apparition de la plaie, comment vous êtes-vous soigné ? Avez-vous consulté quelqu'un avant d'être pris en charge par le CDTLUB ?**

**100. Connaissiez-vous la maladie ulcère de Buruli avant d'être malade vous-même?**

- Oui  Non

**101. Si oui, comment l'avez-vous connu ?**

**102. Aviez-vous vous déjà entendu des messages de sensibilisation?**

- Oui  Non

**103. Si oui, précisez où ? (radio, école, centre de santé, crieurs publics)**

- Radio  Centre de santé  
 Ecole  Autre

Si 'Autre' précisez :

**105. Aviez-vous pris des précautions particulières pour ne pas attraper la maladie?**

- Oui  Non

## **GéAnt**

106. Si oui, lesquelles?

107. Connaissez-vous quelqu'un qui a fait l'ulcère de Buruli dans votre famille ou entourage?

Oui  Non

108. Si oui : précisez qui et en qu'elle année?

### **Rapport avec la maladie (Témoins)**

109. Connaissez-vous la maladie ulcère de Buruli avant ce questionnaire? Si la réponse est Non, passez à la question 117.

Oui  Non

110. Si oui, comment l'avez-vous connu?

111. Avez-vous déjà entendu des messages de sensibilisation ?

Oui  Non

112. Si oui, précisez par qui?

Radios  Crieur public  
 Ecoles  Autre  
 Centres de santé

Si 'Autre' précisez :

114. Avez-vous pris des précautions particulières pour ne pas attraper la maladie?

115. Selon vous, qu'elle(s) est(sont) les causes de cette maladie?

## **GéAnt**

116. Commentaires et observations lors de la prise des coordonnées GPS, des photos et du choix des sites pour la collecte environnementale. Pensez à demander s'il renonce à utiliser la source ou le forage pour la source d'argent.

## Annexe 2 : Document d'approbation du Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé



REPUBLIQUE DU BENIN  
MINISTÈRE DE LA SANTE  
Direction de la Formation, de la Recherche et de la Médecine Traditionnelle  
COMITE NATIONAL D'ETHIQUE POUR LA RECHERCHE EN SANTE

BP 01-882 BENIN  
Tél. +229 21 33 2178/  
21 33 21 63  
[info@sante.gouv.bj](mailto:info@sante.gouv.bj)  
[www.sante.gouv.bj](http://www.sante.gouv.bj)

N° 105 /MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA Cotonou, le 16 décembre 2019

La présidente

A

Monsieur JOHNSON Roch Christian  
COTONOU

**Objet : Avis éthique favorable n° 03 du 26 novembre 2019  
et autorisant la mise en œuvre de votre recherche**



Monsieur,

Le Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé (CNERS) du Bénin, a l'honneur de vous adresser l'avis éthique concernant votre protocole de recherche :

- dont le titre actuel est : **Identification des facteurs géographiques et anthropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**
- étudié le 26 novembre 2019, par ses membres dont les noms suivent :

Mesdames	1) GANGBO	Flore	Messieurs	2) GUEDOU	Fernand
	3) ALE Chacou	Charlotte		HOUNSA	Assomption
	4) AKINSHOLA	Amélie		5) OKRY	Magloire
	6) D'ALMEIDA	Thérèse		7) CHAFFA	Christian
				8) ALLABI	Aurel
				9) HOUSSOU	Paul Ferdinand
				10) MARTIN -CORREA	Louis - Jacques
				11) KOSSOUOH	François
- sur la base des documents soumis :
  - a) Protocole de recherche
  - b) Résumé
  - c) Annexe 1 : Note d'information
  - d) Annexe 2 : Formulaire d'information et fiche de consentement (Formulaire destiné au plus de 18 ans et au représentant légal des enfants de 5 ans à 18 ans : Note d'information sur la recherche ; Fiche de consentement)
  - e) Annexe 3 : Outils de collecte (questionnaire ulcère de Buruli)
  - f) Annexe 4 : Présentation détaillée du curriculum vitae des partenaires
  - g) Engagement à respecter les conditions d'obtention du consentement libre et éclairé
  - h) Budget

- i) Calendrier de mise en œuvre
- j) Curriculum vitae : MARION Estelle ; FLEURET Sébastien ; JOHNSON Roch Christian ; DEGNONVI Horace ; GNIMAYO Ronald Sétondji

- **ainsi que sur la base des avis scientifiques fournis par :**
  - Monsieur HOUNDJI Bidossessi Victor Saturnin
  - Monsieur LOKONON H F. Jaurès**experts sollicités par le chercheur**

Après avoir validé globalement les aspects scientifiques et évalué les aspects éthiques centrés sur : les bénéfices attendus pour la santé des participants à la recherche et ainsi que sur la qualité des informations transmises en vue de l'obtention d'un consentement libre et éclairé, le CNERS a émis un **Avis éthique favorable n° 03 du 26 novembre 2019.**

**Le présent avis éthique favorable est exécutoire et vous autorise à mettre en œuvre la recherche ci-dessus intitulée.**

**Il est valable pour une durée d'un (01) an** à compter de sa date de signature. Passé ce délai, vous êtes tenu de soumettre votre protocole à une nouvelle ré-évaluation du CNERS.

**Par ailleurs, le CNERS vous demande de :**

- 1) **l'informer de toute nouvelle information/ modification**, qui surviendrait à une date ultérieure à cette approbation-ci et qui impliqueraient des changements dans le choix des participants à la recherche, dans la manière d'obtenir leur consentement, dans les risques encourus ou tout événement indésirable survenant dans le cadre du déroulement de cette recherche.

Le CNERS doit, en effet, dans ces cas, ré-évaluer et donner une nouvelle approbation avant l'entrée en vigueur desdites modifications

- 2) **utiliser les documents qu'il a validés;**
- 3) **faire signer au participant, le formulaire de consentement, en deux exemplaires**, dont l'un lui sera remis et l'autre, conservé dans vos dossiers ;
- 4) **lui adresser un rapport, au terme de la validité** de cet avis éthique.

**Le CNERS, se réserve le droit de faire le suivi, de suspendre ou d'arrêter la mise en œuvre de la recherche.**

Tout en vous souhaitant plein succès dans la réalisation de votre recherche, le CNERS vous prie de recevoir Monsieur, ses salutations les meilleures.



**Prof Flore Armande GANGBO**  
*Présidente du CNERS*

Page 2 sur 2

Avis éthique favorable N° 03 du 26/11/ 2019  
Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé

site web : [www.ethique-sante.org](http://www.ethique-sante.org)

courriel : [contact@ethique-sante.org](mailto:contact@ethique-sante.org)

### **Annexe 3 : Formulaire d'Information**

#### **Identification des facteurs Environnementaux et ANThropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**

##### **Principal Investigateur :**

Dr Roch Christian Johnson, Expert Conseiller Médical, Fondation Raoul Follereau, Maître de Conférences des Universités (CAMES) - CIFRED - Université d'Abomey-Calavi - email : [rochchristianjohnson@gmail.com](mailto:rochchristianjohnson@gmail.com). Tel : 00 229 96 22 11 32

##### **Centre Investigateur :**

Ronald GNIMAVO, Responsable médical du Centre de Dépistage et de Traitement de l'ulcère de Buruli, CDTUB Raoul et Madeleine Follereau, B.P 191, Pobè, Bénin / Email : [ronaldgnimavo@gmail.com](mailto:ronaldgnimavo@gmail.com)/ Tel secrétariat : 00 229 20 25 05 08

##### **Responsables scientifiques :**

Dr Estelle Marion, Chargé de Recherche ; Equipe ATIP AVENIR INSERM, CRCINA, INSERM 1232 et Laboratoire de Bactériologie, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49000 Angers - email : [estelle.marion@inserm.fr](mailto:estelle.marion@inserm.fr) (Porteur du projet). Tel 00 33 2 44 68 83 14

Dr Sébastien Fleuret, Directeur de recherche CNRS, laboratoire ESO UMR6590 CNRS, Angers France / Email : [sebastien.fleuret@univ-angers.fr](mailto:sebastien.fleuret@univ-angers.fr) / tel : 00 33 2 41 22 63 40

##### **Responsable en charge des investigations sur le terrain :**

Horace DEGNONVI, Epidémiologiste - Biologiste, Assistant de recherche (CIFRED- Université d'Abomey-Calavi), Email : [degnonviorace@gmail.com](mailto:degnonviorace@gmail.com) / [mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr](mailto:mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr) / tel : 00 229 97 12 25 45

Cette note d'information est destinée spécifiquement aux patients et témoins ayant entre 10 ans et 17 ans qui remplissent les critères d'inclusion énumérés dans le protocole. Cette note d'information sera traduite à l'enfant à mesure de son âge.

## **Note d'information sur la recherche**

### **Identification des facteurs Environnementaux et ANthropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**

#### **Principal Investigateur :**

Dr Roch Christian Johnson, Expert Conseiller Médical, Fondation Raoul Follereau, Maître de Conférences des Universités (CAMES) - CIFRED - Université d'Abomey-Calavi - email : [rochchristianjohnson@gmail.com](mailto:rochchristianjohnson@gmail.com). Tel : 00 229 96 22 11 32

Vous êtes invité à participer à **une étude sur l'ulcère de Buruli**, nommée : **Identification des facteurs Environnementaux et ANthropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**. Vous êtes libre de choisir d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Afin de vous aider à prendre votre décision, ce texte vous informe de l'objectif et des modalités de l'étude.

L'ulcère de Buruli est une maladie infectieuse de la peau provoquée par un microbe (une bactérie nommée *Mycobacterium ulcerans*). Les plaies creusées par ce microbe s'étendent parfois en profondeur jusqu'aux os et articulations. A long terme, les cicatrices peuvent limiter le mouvement de certaines parties du corps. L'objectif de ce travail est de comprendre d'où vient la maladie et comment on la contracte. **L'issue de ce travail contribuera à un meilleur soin de la maladie et votre participation est déterminante pour les autres malades comme pour vous même.**

#### **Liberté de participation**

Votre participation est totalement volontaire. Un refus de participer n'aurait aucune conséquence sur votre droit à être soigné et ne changerait en rien vos relations avec le médecin qui vous a pris en charge.

#### **Déroulement et durée de l'étude**

L'étude consiste en une enquête, environ l'heure, avec un enquêteur formé et qui garantit la confidentialité de toutes vos réponses. Ce même enquêteur vous accompagnera pour relever les coordonnées géographiques des lieux que vous auriez évoqués pendant l'enquête et procédera également à des prélèvements environnementaux dans ces lieux qui sont aquatiques parmi ceux

évoqués. Dans le cas d'un patient/témoin ne comprenant pas le français, les explications et le document seront traduits dans sa langue natale par les investigateurs.

#### Réglementation et confidentialité

Les structures officielles béninoises de santé ont été informées de l'étude. Son protocole a été examiné par le Comité National d'Ethique de la Recherche en Santé (CNERS). Les dossiers de recherche pourraient être inspectés par le CNERS, pour s'assurer du bon déroulement de l'étude.

Toutes les données recueillies demeureront confidentielles et anonymes. Vous aurez le droit de demander l'accès à votre questionnaire pour vérifier les informations qu'il contient et seuls les chercheurs responsables de cette recherche pourront les consulter.

#### Résultats de l'étude

Vous serez informés des résultats globaux à l'issue de la recherche par l'intermédiaire de l'équipe médicale du CDTLUB et les informations collectées pourront être publiées, sous anonymat, dans des revues scientifiques.

A la fin de la recherche, une copie du rapport d'étude sera remise à chacune des structures ci-après :

- Le Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé (CNERS)
- La Direction de la Recherche, de la Formation et de la Médecine Traditionnelle (DRFMT)
- Le Service de la Gestion du Système de l'Information (SGSI/DPP)
- La Direction de la Recherche et de la Formation du Ministère de la Santé et le Service des Statistiques et de la Documentation

#### **Bénéfices et risques de chaque participant à l'étude et avantages collectifs post-étude**

Une forme de compensations collectives ou d'indemnisation individuelle des cas/témoins sera proposée en fonction de chaque contexte socioculturel et imputée à la rubrique « Achat petit matériel » du budget. Un bénéfice indirect est de savoir qu'il contribue à une étude scientifique qui pourrait faire avancer les connaissances sur cette maladie et qu'il participe à mettre au point de meilleures méthodes de diagnostic et de prise en charge de l'ulcère de Buruli. À tout moment, le patient peut revenir sur sa décision et décider de ne plus participer à l'étude.

A la fin de l'étude, les résultats de cette étude permettront à court terme d'implémenter les mesures de prévention identifiées à l'issue de l'étude lors des différentes tournées de consultations

foraines, de sensibilisation et de dépistage organisées chaque semaine par le programme national de lutte contre la lèpre et l'ulcère de Buruli. Nous envisagerons sur le long terme aussi en fonction des résultats de l'étude des interventions en santé publique en fonction du modèle de prévention primaire proposé à l'issue de l'étude. De façon pratique, par exemple, des aménagements techniques des différents points d'eau seraient réalisés avec l'appui des experts partenaires du consortium. Un mécanisme de suivi régulier des différentes interventions en santé publique mises en œuvre serait mis en place afin de consolider et pérenniser les acquis du projet en vue de la réduction de l'incidence de l'ulcère de Buruli à travers ces mesures de prévention.

Par ailleurs, les volontaires qui auront été inclus dans l'étude seront informés des résultats globaux de la recherche via le Dr Johnson et le Dr Houezo qui disposeront d'un rapport d'étude consultable par les patients concernés. De plus, à la fin de l'étude, une copie des résultats sera transmise à chacune des structures ci-après : (i) la Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé, (ii) la Direction de la Recherche et de la Formation du ministère de la santé, (iii) le Service des Statistiques et de la Documentation.

### **Contacts**

Si vous avez des questions, vous pouvez contacter l'épidémiologiste en charge des investigations sur le terrain.

Horace DEGNONVI Tel : 97122545 / Email : [degnonvihorace@gmail.com](mailto:degnonvihorace@gmail.com)

## **Identification des facteurs Environnementaux et ANThropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**

### **Principal Investigateur :**

Dr Roch Christian Johnson, Expert Conseiller Médical, Fondation Raoul Follereau, Maître de Conférences des Universités (CAMES) - CIFRED - Université d'Abomey-Calavi - email : [rochchristianjohnson@gmail.com](mailto:rochchristianjohnson@gmail.com). Tel : 00 229 96 22 11 32

### **Centre Investigateur :**

Ronald GNIMAVO, Responsable médical du Centre de Dépistage et de Traitement de l'ulcère de Buruli, CDTUB Raoul et Madeleine Follereau, B.P 191, Pobè, Bénin / Email : [ronaldgnimavo@gmail.com](mailto:ronaldgnimavo@gmail.com)/ Tel secrétariat : 00 229 20 25 05 08

### **Responsables scientifiques :**

Dr Estelle Marion, Chargé de Recherche ; Equipe ATIP AVENIR INSERM, CRCINA, INSERM 1232 et Laboratoire de Bactériologie, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49000 Angers - email : [estelle.marion@inserm.fr](mailto:estelle.marion@inserm.fr) (Porteur du projet). Tel 00 33 2 44 68 83 14

Dr Sébastien Fleuret, Directeur de recherche CNRS, laboratoire ESO UMR6590 CNRS, Angers France / Email : [sebastien.fleuret@univ-angers.fr](mailto:sebastien.fleuret@univ-angers.fr) / tel : 00 33 2 41 22 63 40

### **Responsable en charge des investigations sur le terrain :**

Horace DEGNONVI, Epidémiologiste - Biologiste, Assistant de recherche (CIFRED- Université d'Abomey-Calavi), Email : [degnonvihorace@gmail.com](mailto:degnonvihorace@gmail.com) / [mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr](mailto:mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr)/ tel : 00 229 97 12 25 45

### **Déroulement et durée de l'étude**

L'étude consiste en une enquête, environ l'heure, avec un enquêteur formé et qui garantit la confidentialité de toutes vos réponses. Ce même enquêteur vous accompagnera pour relever les coordonnées géographiques des lieux que vous auriez évoqués pendant l'enquête et procédera également à des prélèvements environnementaux dans ces lieux qui sont aquatiques parmi ceux évoqués. Dans le cas d'un patient/témoin ne comprenant pas le français, les explications et le document seront traduits dans sa langue natale par les investigateurs.

## **Réglementation et confidentialité**

Les structures officielles béninoises de santé ont été informées de l'étude. Son protocole a été examiné par le Comité National d'Ethique de la Recherche en Santé (CNER). Les dossiers de recherche pourraient être inspectés par le CNER, pour s'assurer du bon déroulement de l'étude.

Toutes les données recueillies demeureront confidentielles et anonymes. Vous aurez le droit de demander l'accès à votre questionnaire pour vérifier les informations qu'il contient et seuls les chercheurs responsables de cette recherche pourront les consulter.

## **Résultats de l'étude**

Vous serez informés des résultats globaux à l'issue de la recherche par l'intermédiaire de l'équipe médicale du CDTLUB et les informations collectées pourront être publiées, sous anonymat, dans des revues scientifiques.

A la fin de la recherche, une copie du rapport d'étude sera remise à chacune des structures ci-après :

- Le Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé (CNER)
- La Direction de la Recherche, de la Formation et de la Médecine Traditionnelle (DRFMT)
- Le Service de la Gestion du Système de l'Information (SGSI/DPP)
- La Direction de la Recherche et de la Formation du Ministère de la Santé et le Service des Statistiques et de la Documentation

## **Bénéfices et risques de chaque participant à l'étude et avantages collectifs post-étude**

Une forme de compensations collectives ou d'indemnisation individuelle des cas/témoins sera proposée en fonction de chaque contexte socioculturel et imputée à la rubrique « Achat petit matériel » du budget. Un bénéfice indirect est de savoir qu'il contribue à une étude scientifique qui pourrait faire avancer les connaissances sur cette maladie et qu'il participe à mettre au point de meilleures méthodes de diagnostic et de prise en charge de l'ulcère de Buruli. À tout moment, le patient peut revenir sur sa décision et décider de ne plus participer à l'étude.

A la fin de l'étude, les résultats de cette étude permettront à court terme d'implémenter les mesures de prévention identifiées à l'issue de l'étude lors des différentes tournées de consultations foraines, de sensibilisation et de dépistage organisées chaque semaine par le programme national de lutte contre la lèpre et l'ulcère de Buruli. Nous envisagerons sur le long terme aussi en fonction des résultats de l'étude des interventions en santé publique en fonction

du modèle de prévention primaire proposé à l'issue de l'étude. De façon pratique, par exemple, des aménagements techniques des différents points d'eau seraient réalisés avec l'appui des experts partenaires du consortium. Un mécanisme de suivi régulier des différentes interventions en santé publique mises en œuvre serait mis en place afin de consolider et pérenniser les acquis du projet en vue de la réduction de l'incidence de l'ulcère de Buruli à travers ces mesures de prévention.

Par ailleurs, les volontaires qui auront été inclus dans l'étude seront informés des résultats globaux de la recherche via le Dr Johnson et le Dr Houezo qui disposeront d'un rapport d'étude consultable par les patients concernés. De plus, à la fin de l'étude, une copie des résultats sera transmise à chacune des structures ci-après : (i) la Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé, (ii) la Direction de la Recherche et de la Formation du ministère de la santé, (iii) le Service des Statistiques et de la Documentation.

### **Contacts**

Si vous avez des questions, vous pouvez contacter l'épidémiologiste en charge des investigations sur le terrain.

Horace DEGNONVI Tel : 97122545 / Email : [degnonviorace@gmail.com](mailto:degnonviorace@gmail.com)

#### **Annexe 4 : Formulaire du consentement éclairé**

Ce formulaire de consentement est destiné aux patients et témoins de plus de 18 ans qui remplissent les critères d'inclusion énumérés dans le protocole. Ce formulaire sera traduit au participant dans une langue qu'il comprend.

#### **Identification des facteurs Environnementaux et ANThropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**

##### **Principal Investigateur :**

Dr Roch Christian Johnson, Expert Conseiller Médical, Fondation Raoul Follereau, Maître de Conférences des Universités (CAMES) - CIFRED - Université d'Abomey-Calavi - email : [rochchristianjohnson@gmail.com](mailto:rochchristianjohnson@gmail.com). \_Tel : 00 229 96 22 11 32

##### **Centre Investigateur :**

Ronald GNIMAVO, Responsable médical du Centre de Dépistage et de Traitement de l'ulcère de Buruli, CDTUB Raoul et Madeleine Follereau, B.P 191, Pobè, Bénin / Email : [ronaldgnimavogmail.com](mailto:ronaldgnimavogmail.com)/ Tel secrétariat : 0@0 229 20 25 05 08

##### **Responsables scientifiques :**

Dr Estelle Marion, Chargé de Recherche ; Equipe ATIP AVENIR INSERM, CRCINA, INSERM 1232 et Laboratoire de Bactériologie, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49000 Angers - email : [estelle.marion@inserm.fr](mailto:estelle.marion@inserm.fr) (Porteur du projet). Tel 00 33 2 44 68 83 14

Dr Sébastien Fleuret, Directeur de recherche CNRS, laboratoire ESO UMR6590 CNRS, Angers France / Email : [sebastien.fleuret@univ-angers.fr](mailto:sebastien.fleuret@univ-angers.fr) / tel : 00 33 2 41 22 63 40

##### **Responsable en charge des investigations sur le terrain :**

Horace DEGNONVI, Epidémiologiste - Biologiste, Assistant de recherche (CIFRED- Université d'Abomey-Calavi), Email : [degnonviorace@gmail.com](mailto:degnonviorace@gmail.com) / [mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr](mailto:mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr)/ tel : 00 229 97 12 25 45

Je soussigné(e), (NOM Prénom)

---

\_\_\_\_\_

ayant la pleine capacité légale de donner mon  
consentement **ou bien**

en ma qualité de titulaire de l'exercice de l'autorité parentale de l'enfant :

**(NOM Prénom)**

Âgé de \_\_\_\_\_,

***donne mon consentement pour participer à l'étude*** « Identification des facteurs  
Environnementaux et ANThropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli  
».

Je suis parfaitement conscient(e) que je suis libre de refuser de participer à cette enquête quelles  
que soient mes raisons et sans que cela ne porte atteinte à mes relations avec le personnel  
soignant du CDTLUB. Mon consentement ne dégage en rien l'investigateur et le promoteur de  
l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Fait à : \_\_\_\_\_ Date : \_\_\_\_\_

Signature (ou empreinte digitale):

Nom et prénom de l'investigateur « Reconnais avoir expliqué au participant les objectifs et les  
avantages de l'étude et reçu son consentement écrit ».

Signature :

## **Annexe 5 : Formulaire du consentement éclairé**

Ce formulaire de consentement est destiné aux patients et témoins de moins de 18 ans et à leurs représentants légaux qui remplissent les critères d'inclusion énumérés dans le protocole.

Ce formulaire sera traduit à l'enfant à mesure de son âge et à son représentant légal.

### **Identification des facteurs Environnementaux et ANthropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli**

#### **Principal Investigateur :**

Dr Roch Christian Johnson, Expert Conseiller Médical, Fondation Raoul Follereau, Maître de Conférences des Universités (CAMES) - CIFRED - Université d'Abomey-Calavi - email : [rochchristianjohnson@gmail.com](mailto:rochchristianjohnson@gmail.com). \_Tel : 00 229 96 22 11 32

#### **Centre Investigateur :**

Ronald GNIMAVO, Responsable médical du Centre de Dépistage et de Traitement de l'ulcère de Buruli, CDTUB Raoul et Madeleine Follereau, B.P 191, Pobè, Bénin / Email : [ronaldgnimavo@gmail.com](mailto:ronaldgnimavo@gmail.com)/ Tel secrétariat : 00 229 20 25 05 08

#### **Responsables scientifiques :**

Dr Estelle Marion, Chargé de Recherche ; Equipe ATIP AVENIR INSERM, CRCINA, INSERM 1232 et Laboratoire de Bactériologie, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49000 Angers - email : [estelle.marion@inserm.fr](mailto:estelle.marion@inserm.fr) (Porteur du projet). Tel 00 33 2 44 68 83 14

Dr Sébastien Fleuret, Directeur de recherche CNRS, laboratoire ESO UMR6590 CNRS, Angers France / Email : [sebastien.fleuret@univ-angers.fr](mailto:sebastien.fleuret@univ-angers.fr) / tel : 00 33 2 41 22 63 40

#### **Responsable en charge des investigations sur le terrain :**

Horace DEGNONVI, Epidémiologiste - Biologiste, Assistant de recherche (CIFRED- Université d'Abomey-Calavi), Email : [degnonviorace@gmail.com](mailto:degnonviorace@gmail.com) / [mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr](mailto:mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr)/ tel : 00 229 97 12 25 45

Je soussigné(e), (NOM Prénom)

\_\_\_\_\_

—,

ayant la pleine capacité légale de donner mon  
consentement **ou bien**

en ma qualité de titulaire de l'exercice de l'autorité parentale de l'enfant :

**(NOM Prénom)**

Âgé de \_\_\_\_\_,

***donne mon consentement pour participer à l'étude*** « Identification des facteurs  
Environnementaux et ANThropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli  
».

Je suis parfaitement conscient(e) que je suis libre de refuser de participer à cette enquête quelles  
que soient mes raisons et sans que cela ne porte atteinte à mes relations avec le personnel  
soignant du CDTLUB. Mon consentement ne dégage en rien l'investigateur et le promoteur de  
l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Fait à : \_\_\_\_\_ Date :

Signature (ou empreinte digitale):

Nom et prénom de l'investigateur « Reconnais avoir expliqué au participant les objectifs et les  
avantages de l'étude et reçu son consentement écrit ».

Signature

**Annexe 6 :** Formulaire du consentement éclairé pour les sujets de moins de 18 ans

Ce formulaire de consentement est destiné aux patients et témoins de moins de 18 ans et à leurs représentants légaux qui remplissent les critères d'inclusion énumérés dans le protocole

Ce formulaire sera traduit à l'enfant à mesure de son âge et à son représentant légal.

Identification des facteurs Environnementaux et ANThropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli

Principal Investigateur :

Dr Roch Christian Johnson, Expert Conseiller Médical, Fondation Raoul Follereau, Maître de Conférences des Universités (CAMES) - CIFRED - Université d'Abomey-Calavi - email : [rochchristianjohnson@gmail.com](mailto:rochchristianjohnson@gmail.com). Tel : 00 229 96 22 11 32

Centre Investigateur :

Ronald GNIMAVO, Responsable médical du Centre de Dépistage et de Traitement de l'ulcère de Buruli, CDTUB Raoul et Madeleine Follereau, B.P 191, Pobè, Bénin / Email : [ronaldgnimavo@gmail.com](mailto:ronaldgnimavo@gmail.com)/ Tel secrétariat : 00 229 20 25 05 08

Responsables scientifiques :

Dr Estelle Marion, Chargé de Recherche ; Equipe ATIP AVENIR INSERM, CRCINA, INSERM 1232 et Laboratoire de Bactériologie, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49000 Angers - email : [estelle.marion@inserm.fr](mailto:estelle.marion@inserm.fr) (Porteur du projet). Tel 00 33 2 44 68 83 14

Dr Sébastien Fleuret, Directeur de recherche CNRS, laboratoire ESO UMR6590 CNRS, Angers France / Email : [sebastien.fleuret@univ-angers.fr](mailto:sebastien.fleuret@univ-angers.fr) / tel : 00 33 2 41 22 63 40

Responsable en charge des investigations sur le terrain :

Horace DEGNONVI, Epidémiologiste - Biologiste, Assistant de recherche (CIFRED- Université d'Abomey-Calavi), Email : [degnonviorace@gmail.com](mailto:degnonviorace@gmail.com) / [mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr](mailto:mahougnon.degnonvi@etud.univ-angers.fr)/ tel : 00 229 97 12 25 45

Je soussigné(e), (NOM Prénom)

\_\_\_\_\_

—,

ayant la pleine capacité légale de donner mon  
consentement **ou bien**

en ma qualité de titulaire de l'exercice de l'autorité parentale de l'enfant :

(NOM Prénom) \_\_\_\_\_

Âgé de \_\_\_\_\_,

***donne mon consentement pour participer à l'étude*** « Identification des facteurs  
Environnementaux et ANThropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli  
».

Je suis parfaitement conscient(e) que je suis libre de refuser de participer à cette enquête quelles  
que soient mes raisons et sans que cela ne porte atteinte à mes relations avec le personnel  
soignant du CDTLUB. Mon consentement ne dégage en rien l'investigateur et le promoteur de  
l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Fait à : \_\_\_\_\_ Date :

Signature (ou empreinte digitale):

Nom et prénom de l'investigateur « Reconnais avoir expliqué au participant les objectifs et les  
avantages de l'étude et reçu son consentement écrit ».

Signature

**Annexe 7 : Outil de collecte des échantillons environnementaux**

FICHE DE PRELEVEMENT		Projet GEANT		
<b>Identification du lieu</b>				
	Commune	Arrondissement	Village	Quartier
Localité				
Coordonnées GPS				
Date de collecte				
<b>Numéro de collecte*</b>		*doit être indiqué sur tous les pots collectés		
Numéro de photos				
<b>Végétaux aquatiques</b> les 3 majoritaires collecter un échantillon de feuilles, tiges, racines				
Nombre de pots de 50ml :				
<b>Commentaires :</b>				
<b>Vertébrés, invertébrés et matières organiques</b> la totalité sur 10 coups d'épuisettes				
Nombre de pots de 50ml				
Nombre de pots de 200ml				
<b>Commentaires :</b>				

### **Annexe 8 : Participation à divers colloques et rencontres scientifiques**

- 3<sup>ème</sup> Journées scientifiques de l'Institut Régional de Santé Publique-Comlan Alfred QUENUM (IRSP-CAQ) les 7 et 8 décembre 2018, Ouidah, Bénin.
- 17<sup>ème</sup> réunion annuelle sur l'ulcère de Buruli du 25 - 27 mars 2019, OMS siège, Genève, Suisse.
- 4<sup>ème</sup> Journées scientifiques de l'Institut Régional de Santé Publique-Comlan Alfred QUENUM (IRSP-CAQ) les 3 et 4 décembre 2020, Ouidah, Bénin.
- 3<sup>ème</sup> édition des Journées Scientifiques Ecole Doctorale Biologie Santé 2020 du 10 – 11 Décembre 2020, Nantes, France.
- PhD Students' Scientific Days, February, 25<sup>th</sup> and march, 04<sup>th</sup> 2021, Nantes – Angers, France.
- Journées scientifiques de la SFR ICAT le 11 juin 2021, Nantes – Angers, France.

### **Annexe 9 : Publications scientifiques**

#### **Publications issues directement du travail de thèse :**

- Tabah EN, Johnson CR, **Degnonvi H**, Pluschke G, Röltgen K: **Buruli Ulcer in Africa**. In *Buruli Ulcer*. Springer; 2019: 43-60
- **Degnonvi H**, Fleuret S, Coudereau C, Gnimavo R, Giffon S, Yeramian E, Johnson RC, Marion E: **Effect of well drilling on Buruli ulcer incidence in Benin: a case-control, quantitative survey**. *The Lancet Planetary Health* 2019, **3**:e349-e356.
- **Degnonvi H\***, Bocarroso A\*, Brou T., Robbe-Saule M, Esnault L, Boucaud Y, Eveillard M, Gnimavo R, Hounsou S, Djenontin A, Johnson RC, Fleuret S, Marion E : **A combined field study of Buruli ulcer disease in southeast Benin using epidemiological, geographical, behavioral and environmental analysis to propose preventive strategies**. *Plos Global Health* 2021.

#### **Publications issues de collaborations au sein des laboratoires au cours de la thèse**

- Gnimavo R, **Degnonvi H**, Besnard A, Kempf M, Johnson RC, Bocarroso A, Brou T, Marion E : **Molecular and epidemiological characterization of recurrent Mycobacterium ulcerans infections in Benin**. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2021.
- Parfait DJOSSOU, Ghislain Emmanuel SOPOH, Ronald Sètonджи GNIMAVO, Esai Gimatal ANAGONOU, Franck Zinsou Maurille MIGNANWANDE, Zoukifl Salou BACHIROU, Akpéédjé Carolle WADAGNI, **Horace DEGNONVI**, Flora Sylvie

HOUNDJREBO, Jean Gabin HOUEZO, Yves Thierry BAROGUI and Roch Christian JOHNSON : **Integrated approach in the control of neglected tropical diseases with cutaneous manifestations in four municipalities in Benin: A cross-sectional study.** *Journal of Public Health and Epidemiology*, 2021.

- Zoukifl SALOU BACHIROU ST, Vignon Dégbédji BEDIE, **Horace DEGNONVI**, Gratien BONI, Yehinou Iris Astrid FANDOHAN, Iyabo Léa Hermione AMOUKPO, Damien TOFFA, Gabriel Diez, Roch Christian JOHNSON %J Les cahiers du CBRST. **Effets des interventions de promotion de l'hygiène et de l'assainissement sur les connaissances, attitudes et pratiques (cap) en eau, hygiène et assainissement des membres de groupements de l'arrondissement de Sèdjè-Denou dans la commune de Zè.** 2019(N°15, 1er semestre 2019):184-200.
- Hermione Amoukpo NS, Tamègnon Victorien Dougnon, Zoukifl Salou Bachirou, **Horace Degnonvi**, Michel Boko, Roch Christian Johnson %J International Journal of Ecological Science, Engineering E. **Sensitivity of Strains of Escherichia coli and Staphylococcus aureus Identified in Drinking Water to Commonly-Used Antibiotics in Lalo, Benin.** 2018;5(2):52-7.
- Amoukpo H, Bachirou ZS, Diez G, Akuesson L, Lanignan R, **Degnonvi H**, et al. **Knowledge, attitudes and practices of the population of the district of Ahomadégbé (Municipality of Lalo) in Benin on methods of water treatment at home.** 2018;10(3):251-65.

## Tables des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Introduction .....	1
Chapitre 1. Synthèse bibliographique et fondements théoriques.....	3
1.1 Etat des connaissances sur l'ulcère de Buruli.....	4
1.1.1 Définition.....	4
1.1.2 Histoire d'une maladie cutanée mystérieuse.....	4
1.1.3 Epidémiologie descriptive .....	5
1.1.3.1 Ampleur.....	5
1.1.3.2 Répartition géographique.....	5
1.1.3.3 Hôte, répartition par âge et sexe .....	7
1.1.4 Epidémiologie analytique.....	7
1.1.4.1 Agent pathogène .....	7
1.1.4.2 La mycolactone et l'ulcère de Buruli .....	9
1.1.4.3 Ecologie et mode de transmission .....	11
1.1.4.4 Saisonnalité de la transmission.....	17
1.1.4.5 Mécanisme étiopathogénique de l'infection à <i>Mycobacterium ulcerans</i> .....	19
1.1.4.6 Facteurs de risque et prévention de l'ulcère de Buruli .....	19
1.1.5 Diagnostic de l'ulcère de Buruli .....	23
1.1.6 Aspects cliniques.....	27
1.1.6.1 Les trois stades cliniques de l'ulcère de Buruli.....	27
1.1.6.2 L'ostéite .....	32
1.1.6.3 Les atteintes multifocales .....	32
1.1.7 Traitement et réactions paradoxales .....	32
1.2 Problématique.....	36
1.2.1 Enoncé du problème.....	36
1.2.3 Hypothèses .....	44
1.2.4 Objectifs .....	44

<b>Chapitre 2. Buruli ulcer in Africa : Benin and Cameroon Cases .....</b>	<b>45</b>
<b>Chapitre 3. Cadre et méthodes.....</b>	<b>65</b>
<b>3. Cadre et méthodes .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1 Cadre d'étude .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.1 Présentation du cadre d'étude.....</b>	<b>66</b>
<b>3.1.2 Présentation du CDTLUB de Pobè .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1.3 Les sites d'étude.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2 Méthodes .....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.1 Facteurs de risque comportementaux associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli.....</b>	<b>70</b>
<b>3.2.2 La répartition spatiale de <i>Mu</i> dans l'environnement par la réalisation d'étude écologique..</b>	<b>74</b>
<b>3.2.3 Interaction entre l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de <i>Mu</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>3.2.4 Considérations éthiques et consentement éclairé .....</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre 4. Effect of well drilling on Buruli ulcer incidence in Benin : a case-control, quantitative survey.....</b>	<b>78</b>
<b>Chapitre 5. A combined field study of Buruli ulcer disease in southeast Benin using epidemiological, geographical, behavioral and environmental analysis to propose preventative strategies.....</b>	<b>89</b>
<b>Chapitre 6 : Discussion générale.....</b>	<b>130</b>
<b>6.1 Impact de l'accès et l'utilisation de l'eau du forage sur la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli au Bénin.....</b>	<b>131</b>
<b>6.2 Etude de terrain dans le Sud-Est du Bénin, combinant des analyses épidémiologiques, environnementales et géographiques pour proposer des stratégies préventives contre l'ulcère de Buruli.....</b>	<b>135</b>
<b>6.3 Le développement d'un modèle de prévention primaire : un outil d'interventions en santé publique au sein des communautés endémiques.....</b>	<b>141</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>144</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>146</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>147</b>

## Abstract

Buruli ulcer or *Mycobacterium ulcerans* infection is an emerging tropical disease neglected by World Health Organization (WHO) criteria. It has become the third mycobacteriosis in the world after tuberculosis and leprosy. To date, preventive measures are insufficient due to a lack of knowledge of the modes of transmission of the bacteria. The implementation of preventive measures is a key element in controlling this infectious disease. The development of suitable preventive measures requires the implementation of a global approach integrating a better knowledge of human behavior.

The present work, which consisted in the analysis of data from Buruli ulcer patients treated at the Centre de Dépistage et de Traitement de Lèpre et de l'Ulcère de Buruli (CDTLUB) of Pobè in Benin, collected in the framework of epidemiological, ecological and microbiological studies, had the following objectives: 1) Determine behavioral risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection, 2) Measure the rate of environmental contamination by *Mycobacterium ulcerans*, 3) Analyze the interactions between the environment, the lifestyle of the patients and the ecology of *Mycobacterium ulcerans*.

The present study, carried out with an approach involving several disciplines (medicine, epidemiology, microbiology, spatial analysis and health geography), consists of two parts. The first part corresponds to the epidemiological case-control study. The analyses in this part used data from 217 patients treated by the CDTLUB of Pobè from 2005 to 2020 and 434 controls. The conditional logistic regression model was used to identify the environmental and anthropic factors associated with the variation in the incidence of Buruli ulcer. The second part corresponds to the ecological and microbiological studies. Analyses were performed on 815 pools of environmental samples (aquatic plants, aquatic vertebrates and invertebrates, and organic matter) collected from 90 major unprotected water source sites frequented by patients. Testing for *Mycobacterium ulcerans* positivity using the Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) technique was performed on extracted and purified DNA from the samples. Testing for *Mycobacterium ulcerans* positivity by the Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR) technique was performed on extracted and purified DNA from the samples. A positivity rate of 27% of the 90 main sites surveyed was found. The environments most contaminated by *Mycobacterium ulcerans* are located at more than 67% in the lowlands. Orthopterans, Hymenoptera, Heteroptera and other invertebrates including molluscs, arachnids, decapods and odonates are the most contaminated. The majority of contaminated sites are located in the communes of Adjohoun, Bonou and Dangbo in the Ouémé department.

The human behaviors most at risk identified are accessing and using unprotected water points located in lowlands (OR = 10.8; 95% CI = 1, 09 to 107.59) for the various daily activities. On the other hand, access and use of drilling water (OR = 0.2; 95% CI = 0.08-0.44) and the knowledge of the population about Buruli ulcer before they contract the disease (OR = 0.2; 95% CI = 0.07-0.39) are protective factors for the disease.

Our results show that access to and use of clean water from a drilling confers protection against Buruli ulcer. Combining the results of the different analyses, we concluded that the risk factor most associated with the development of Buruli ulcer is the frequency of contact with natural and unprotected water sources, especially when these water points are located in lowland areas that are regularly flooded or irrigated.

Our work finally shows that the incidence of Buruli ulcer is positively correlated with the high seasonality of surface water. Boroughs with high seasonality have a high number of new cases, whereas those without seasonality with permanent water points have a low number of cases, even if they are crossed by the Ouémé River.

The results and methods of this study finally allowed us to propose a primary prevention model adapted to endemic areas and could be used for further investigations on Buruli ulcer and other neglected tropical diseases.

All these results highlight the need to develop an integrated approach to control Buruli ulcer within a unique framework "One Health Initiative - One World One Medicine One Health" responding to WHO priorities. It makes the care of patients and the prevention of neglected tropical diseases more efficient in exposed populations.

## Résumé

L'ulcère de Buruli ou infection à *Mycobacterium ulcerans* est une maladie émergente tropicale négligée selon les critères de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS). Elle est devenue la troisième mycobactériose humaine dans le monde après la tuberculose et la lèpre. Jusqu'à ce jour, les mesures préventives sont insuffisantes en raison d'une méconnaissance des modes de transmission de la bactérie. La mise en place de mesures préventives est un élément clé pour contrôler cette maladie infectieuse. Le développement de mesures préventives adaptées requiert la mise en œuvre d'une approche globale intégrant une meilleure connaissance des comportements humains.

Le présent travail, qui a consisté en l'analyse des données provenant des patients d'ulcère de Buruli traités au Centre de Dépistage et de Traitement de Lèpre et de l'Ulcère de Buruli (CDTLUB) de Pobè au Bénin, collectées dans le cadre d'études épidémiologique, écologique et microbiologique, avait pour objectifs de : 1) Déterminer les facteurs comportementaux à risque pour l'infection à *Mycobacterium ulcerans*, 2) Mesurer le taux de contamination environnementale par *Mycobacterium ulcerans*, 3) Analyser les interactions entre l'environnement, le mode de vie des patients et l'écologie de *Mycobacterium ulcerans*.

La présente étude, réalisée avec une approche impliquant plusieurs disciplines (médecine, épidémiologie, microbiologie, analyse spatiale et géographie de la santé), comprend deux parties. La première partie correspond à l'étude épidémiologique cas - témoins. Les analyses de cette partie ont exploité les données de 217 patients traités par le CDTLUB de Pobè de 2005 à 2020 et 434 témoins. Le modèle de régression logistique conditionnelle a été utilisé pour identifier les facteurs environnementaux et anthropiques associés à la variation de l'incidence de l'ulcère de Buruli. La seconde partie correspond aux études écologique et microbiologique. Les analyses ont porté sur 815 pools d'échantillons environnementaux (plantes aquatiques, vertébrés et invertébrés aquatiques et des matières organiques) collectés sur 90 principaux sites de sources d'eau non protégés fréquentés par les patients. Le test de positivité à *Mycobacterium ulcerans* par la technique qPCR « Quantitative Polymerase Chain Reaction » a été réalisé sur les ADN extraits et purifiés issus des échantillons. Un taux de positivité de 27% des 90 principaux sites prospectés a été trouvé. Les environnements les plus contaminés par *Mycobacterium ulcerans* sont situés à plus de 67% dans les basfonds. Les orthoptères, hyménoptères, hétéroptères et autres invertébrés dont les mollusques, arachnides, décapodes et odonates sont les plus contaminés. La majorité des sites contaminés sont répartis sur les communes de Adjohoun, Bonou et Dangbo dans le département de l'Ouémé.

Les comportements humains les plus à risque identifiés sont l'accès et l'utilisation des points d'eau non protégés situés dans les bas-fonds (OR = 10,8 ; IC à 95 % = 1,09 à 107,59) pour les différentes activités quotidiennes. En revanche, l'accès et l'utilisation de l'eau de forage (OR = 0,2 ; 95 % IC = 0,08-0,44) et la connaissance de la population sur l'ulcère de Buruli avant qu'elle ne contracte la maladie (OR = 0,2 ; IC à 95% = 0,07-0,39) sont des facteurs protecteurs de la maladie.

Nos résultats révèlent que l'accès et l'utilisation d'eau propre provenant du forage confèrent une protection contre l'ulcère de Buruli. En combinant les résultats des différentes analyses, nous avons ainsi conclu que le facteur de risque le plus associé à l'apparition de l'ulcère de Buruli est la fréquence des contacts avec des sources d'eau naturelles et non protégées, surtout lorsque ces points d'eau sont situés dans les zones de bas-fonds régulièrement inondées ou irriguées.

Il ressort de nos travaux que l'incidence de l'ulcère de Buruli est positivement corrélée avec la saisonnalité élevée de l'eau de surface. Les arrondissements à forte saisonnalité ont ainsi un nombre élevé de nouveaux cas alors que ceux sans saisonnalité avec des points d'eau permanents ont un nombre faible de cas même s'ils sont traversés par le fleuve Ouémé.

Les résultats et méthodes de cette étude nous ont permis enfin de proposer un modèle de prévention primaire adapté aux zones endémiques et pourront servir à des investigations plus poussées sur l'ulcère de Buruli et d'autres maladies tropicales négligées.

Tous ces résultats soulignent la nécessité de développer une approche intégrée pour lutter contre l'ulcère de Buruli dans un cadre unique « One Health Initiative - One World One Medicine One Health » répondant aux priorités de l'OMS. Elle permet de rendre la prise en charge des patients et la prévention des maladies tropicales négligées plus efficaces dans les populations exposées.