

Micronecta sp (Corixidae) et Diplonychus sp (Belostomatidae), deux hémiptères aquatiques hôtes et/ou vecteurs potentiels de Mycobacterium ulcerans agent pathogène de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire

Doannio JMC¹, Konan KL¹, Dosso FN¹, Koné AB², Konan YL², Sankaré Y³, Ekaza E⁴, Coulibaly ND⁴, Odéhourri KP², Dosso M⁴, Sess ED¹, Marsollier L⁵, Aubry J⁶

1. Institut National de Santé Publique

2. Institut National de l'Hygiène Publique

3. Centre de Recherches Océanologiques

4. Institut Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire

5. Groupe d'Etude des Interactions Hôtes Parasites (GEIHP), Université d'Angers

6. Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Nantes, France

Med Trop 2011; **71** : 53-57

RÉSUMÉ • En Côte d'Ivoire, l'ulcère de Buruli constitue aujourd'hui un véritable problème de santé publique. C'est une des maladies tropicales négligées qui est très liée à l'écosystème aquatique. La transmission humaine de *Mycobacterium ulcerans*, impliquerait entre autres des insectes notamment des punaises aquatiques appartenant à l'ordre des hémiptères. Des études préliminaires réalisées sur ces insectes à Sokrogbo, un village du district sanitaire de Tiassalé où l'ulcère de Buruli est endémique ont permis d'identifier deux punaises aquatiques, une du genre *Micronecta* appartenant à la famille des Corixidae et l'autre du genre *Diplonychus* de la famille des Belostomatidae qui seraient colonisées par le bacille. La technique de la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) a révélé des signatures moléculaires de *M. ulcerans* dans les tissus de ces insectes. Ces deux punaises aquatiques seraient hôtes et/ou vecteurs potentiels de *M. ulcerans* dans la zone de notre étude. Le genre *Micronecta* n'a pas encore été signalé dans la littérature comme hôte de *M. ulcerans* contrairement à la seconde. Des investigations plus poussées sont envisagées pour mieux préciser leur rôle, dans la transmission de *M. ulcerans* en Côte d'Ivoire.

MOTS-CLÉS • *Micronecta sp* (Corixidae). *Diplonychus sp* (Belostomatidae). *Mycobacterium ulcerans*. Ulcère de Buruli. Côte d'Ivoire.

MICRONECTA SP (CORIXIDAE) AND DIPLONYCHUS SP (BELOSTOMATIDAE), TWO AQUATIC HEMIPTERA HOSTS AND/OR POTENTIAL VECTORS OF MYCOBACTERIUM ULCERANS (PATHOGENIC AGENT OF BURULI ULCER) IN COTE D'IVOIRE

ABSTRACT • Buruli ulcer is currently a major public health problem in Côte d'Ivoire. It is a neglected tropical disease closely associated with aquatic environments. Aquatic insects of the Hemiptera order have been implicated in human transmission of *Mycobacterium ulcerans*, the pathogenic agent of Buruli ulcer. The purpose of this preliminary study using the polymerase chain reaction (PCR) method was to evaluate aquatic insects in Sokrogbo, a village in the Tiassalé sanitary district where Buruli ulcer is endemic. Findings identified two water bugs hosting *Mycobacterium ulcerans*, i.e., one of the *Micronecta* genus in the Corixidae family and another of the *Diplonychus* genus in the Belostomatidae family. The PCR technique used revealed the molecular signatures of *M. ulcerans* in tissue from these two insects. Based on these findings, these two water bugs can be considered as potential hosts and/or vectors of *M. ulcerans* in the study zone. Unlike *Diplonychus sp.*, this is the first report to describe *Micronecta sp* as a host of *M. ulcerans*. Further investigation will be needed to assess the role of these two water bugs in human transmission of *M. ulcerans* in Côte d'Ivoire.

KEY WORDS • *Micronecta sp* (Corixidae). *Diplonychus sp* (Belostomatidae). *Mycobacterium ulcerans*. Buruli ulcer. Cote d'Ivoire.

En Côte d'Ivoire, l'ulcère de Buruli (UB) constitue aujourd'hui un véritable problème de santé publique. C'est une infection humaine à tropisme essentiellement cutané, causée par *Mycobacterium ulcerans* (1). Maladie émergente considérée par l'OMS comme une maladie tropicale négligée (2), elle touche plus d'une trentaine de pays répartis surtout dans les régions intertropicales à climat chaud et humide (3) et est particulièrement répandue en Afrique de l'Ouest autour du golfe de Guinée. L'OMS estime qu'au moins 100 000 enfants et adultes sont malades en Afrique. Ces 20 dernières années, le nombre de foyers d'UB détectés a augmenté probablement du fait de la modification des écosystèmes (riziculture, barrages, déforestation...).

En Côte d'Ivoire, la première observation a été faite en 1978 chez un jeune Français ayant fréquenté le lac Kossou, lac de retenue d'un barrage hydro-électrique, au centre du pays (4). L'UB n'est pas une maladie contagieuse et le taux de mortalité des personnes malades est inférieur à 5%. Cependant, elle est effroyablement invalidante (5). Les foyers endémiques de l'UB sont multiples, se répartissant sur tout le territoire. Toutefois, les régions du Centre, du Centre-Ouest, de l'Ouest, du Sud-ouest et du Nord-est sont particulièrement touchées. En 1998, le taux d'incidence de l'UB a atteint 22% dans certains villages. Actuellement, l'UB est la deuxième maladie mycobactérienne après la tuberculose et avant la lèpre en Côte d'Ivoire (6). Les déplacements de population suscités par la récente crise militaro-politique ivoirienne, ont certainement contribué à augmenter le nombre de cas. Le traitement de l'UB reste essentiellement médicochirurgical (3).

• Correspondance : jdoannio@yahoo.fr

• Article reçu le 24/02/2010, définitivement accepté le 11/10/2010

La transmission humaine de la maladie est probablement transcutanée directe à partir du réservoir hydro-tellurique, mais certains insectes piqueurs pourraient y jouer un rôle (2, 5, 7-10). D'autres invertébrés aquatiques associés aux hémiptères aquatiques phytophages ou carnivores (mollusques aquatiques, larves de libellules, de coléoptères, d'éphéméroptères, de moustiques, etc...) seraient des hôtes intermédiaires entre les végétaux et les hémiptères aquatiques prédateurs (notamment des punaises d'eau douce). Il a été montré par PCR que les végétaux, les mollusques et des poissons pouvaient être contaminés transitoirement par *M. ulcerans* (11, 12). La contamination de l'homme se ferait au cours de ses activités (riziculture, pisciculture, pêche, travaux champêtres, etc...) ou lors d'approvisionnement en eau à partir des mares et des

marigots ou lors de baignades en zones endémiques (13). Les victimes de la maladie, vivent généralement à proximité de zones marécageuses, où les insectes aquatiques pullulent. Le mode de transmission reste encore mal connu. Tous ces facteurs ont un impact sur la vie sociale et économique des populations menacées par ce fléau émergent. Il apparaît donc urgent d'identifier les hôtes intermédiaires et/ou vecteurs de *M. ulcerans* en vue d'améliorer les moyens de prévention de la maladie par la rupture de la chaîne épidémiologique. L'identification et une bonne connaissance de la biologie, de l'écologie et de l'éthologie des éventuels invertébrés aquatiques hôtes intermédiaires et/ou vecteurs de *M. ulcerans*, devraient permettre la mise en place de stratégies efficaces de prévention et de lutte contre l'UB en Afrique tropicale et plus particulièrement en Côte d'Ivoire.



Figure 1. Localisation du village de Sokrogbo dans le district sanitaire de Tiassalé (Côte d'Ivoire).

Matériel et méthodes

Description du site d'étude

Nos investigations préliminaires ont été réalisées dans le district sanitaire de Tiassalé (05° 53 de latitude Nord et 04° 49 de longitude Ouest) situé dans le bassin du fleuve Bandama. Le district de Tiassalé a une population totale estimée à 245 115 habitants. Les prélèvements d'échantillons biologiques environnementaux ont été faits dans le village de Sokrogbo (figure 1). Ce village est situé dans le bassin du fleuve Bandama qui en raison de son orientation Nord-Sud, recouvre des zones différentes sur le plan climatique et biogéographique (14). La population du village a été estimée à 1990 habitants. Les Dida constituent l'ethnie majoritaire qui cohabite avec les autochtones et des allogènes (Burkinabé et Maliens notamment). L'âge moyen de la population est estimé à 30 ans. L'activité agricole principale est la riziculture de bas-fonds.

Le village dispose d'un centre de santé rural composé d'un dispensaire et d'une maternité dirigés respectivement par un infirmier et une sage femme diplômés d'Etat. Le centre de santé reçoit les malades des villages et campements environnants. L'infirmier a été formé à la détection et à la prise en charge des cas d'UB par l'ONG «Map International» qui œuvre dans le domaine.

Le village est également doté de cinq forages de puits dont un seul est actuellement fonctionnel. La population est alors contrainte de recourir aux quelques mares permanentes et temporaires situées dans le périmètre du village pour s'approvisionner en eau pour les besoins domestiques, surtout en période de saison sèche. Sur la base des informations qui nous ont été fournies par l'infirmier des prélèvements d'échantillons de macroinvertébrés aquatiques ont été réalisés dans la principale mare permanente située à proximité du village (figure 2).

Collecte des données épidémiologiques

Les données épidémiologiques ont été obtenues à partir du dépouillement du registre de prise en charge des cas d'UB tenu par l'infirmier du centre de santé de Sokrogbo. Nous avons pris en compte les cas notifiés de novembre 2004 à novembre 2007 (les différentes formes cliniques rencontrées, le nombre de cas de chaque forme clinique, les motifs de sorties).



Figure 2. Mare permanente, principale source d'approvisionnement en eau de la population et lieu de baignade des enfants à Sokrogbo (Tiassalé - Côte d'Ivoire).

Collecte des données entomologiques

Cette étude a été réalisée de mai à août 2007 pendant la grande saison des pluies et en janvier 2008 pendant la grande saison sèche. Les prélèvements d'échantillons de macroinvertébrés aquatiques ont été effectués mensuellement les après midis en utilisant deux méthodes de récolte des insectes aquatiques : le filet-époussette classique emmanché (type filet Troubleau) et le filet en «U» (figure 3). Le dernier est monté sur deux supports sous forme de «U». Il comprend 1 mètre de filet de 1mm x 1mm de maille, de 1,10 m de long sur 0,97 m de large. Les supports permettent de maintenir le filet ouvert pendant la manipulation. Il est utilisé surtout pour collecter la macrofaune associée aux plantes des berges des étangs. La faune des berges des étangs est l'ensemble des animaux présents sur les plantes fixées ou non sur les berges. Il est maintenu stable dans l'eau, soit fixé, soit tenu par un opérateur tandis qu'un autre barbote l'eau à l'aide des mains en amont sur une surface de 5 m x 5 m (25 m²) et en s'orientant vers le filet. Cette action permet de perturber les animaux enfouis dans le sédiment ou associés aux macrophytes aquatiques fixés et qui dans leur fuite sont piégés en même temps que les détritiques par le filet.

La faune récoltée a été fixée dans l'éthanol à 70 % et ramenée au laboratoire dans des pots fermés pour le tri et la détermination des spécimens. Pour des raisons de facilité, les échantillons peuvent être fractionnés en 2 parties sur des tamis de tailles différentes (respectivement, mailles de 4 mm et 1 mm). Cependant, cette séparation est facultative. Le tri s'est effectué à vue et a consisté à prélever tous les organismes de l'échantillon et à les séparer grossièrement en grands groupes systématiques dans des flacons (tubes de Falcon) contenant de l'éthanol à 70°. Tous les échantillons de punaises d'eau ont été conservés par lots monospécifiques (1 à 15 spécimens) dans des tubes Falcon contenant de l'éthanol pour la recherche de *M. ulcerans*. Les insectes aquatiques prélevés dans la principale mare permanente de Sokrogbo ont été identifiés sous une loupe binoculaire au plan taxonomique au niveau du genre et de l'espèce quand cela était possible à l'aide d'un catalogue iconographique des insectes aquatiques de Côte d'Ivoire élaboré par Dejoux et collaborateurs (15).

En janvier 2008, 35 échantillons de salives ont été prélevés chez un des insectes pour lequel cela était aisé (*Diplonychus* sp de la famille des Belostomatidae). La salivation des insectes a été obtenue directement en les excitant à l'aide d'une pince entomologique et en introduisant leur rostre dans un cône de micropipette.



Figure 3. a. Filet en U. b. Filet de type Troubleau. c. Filet-époussette classique emmanché.

Recherche de signatures moléculaires de *M. ulcerans* dans les lots mono spécifiques et d'échantillons de salives d'insectes prélevés

De mai à août 2007, 35 lots mono spécifiques d'insectes aquatiques récoltés dans la principale mare permanente de Sokrogo ont été analysés par « Nested-PCR » par l'Unité de Microbiologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Les lots mono spécifiques d'insectes conservés dans de l'éthanol à 70° pour la recherche par PCR de signatures moléculaires de *M. ulcerans* ont été broyés dans des mortiers à l'aide de l'eau pour préparation injectable. L'extraction de l'ADN a été réalisée selon la méthode de Boom modifiée, en utilisant les solutions du kit Nuclisens (Biomérieux, réf. 284044 et 284047). La séquence d'insertion IS 2404 a été recherchée par Nested PCR (16,17).

Pour la recherche de signatures moléculaires de *M. ulcerans* à partir des 35 échantillons de salives d'insectes prélevés en janvier 2008, la purification de l'ADN et la recherche de la séquence IS 2404 ont été effectuées comme précédemment décrite.

Résultats

Données épidémiologiques

Le nombre de cas de formes cliniques d'UB notifiés au centre de santé de Sokrogo et les motifs de sorties de novembre 2004 à novembre 2007 sont présentés dans le tableau 1. L'âge moyen global est estimé à 23,46 ans, celui des femmes est de 22,66 ans.

Données entomologiques.

Huit familles de macro-invertébrés et huit genres ont été identifiés parmi les échantillons prélevés dans la principale mare permanente où les populations se ravitaillent en eau pour les besoins domestiques. La détermination spécifique n'a pu être faite que dans trois cas, faute de la disponibilité d'une bonne clé de détermination taxonomique des insectes aquatiques africains. *Micronecta sp* de la famille des Corixidae s'est avéré nettement prédominant avec 462 individus représentant 78,31 % du total des spécimens prélevés (tableau 2).

Données mycobactériologiques.

Trente-cinq lots mono spécifiques d'insectes constitués de 29 lots de *Micronecta sp*, de 2 lots d'*Anisops sp*, 1 lot d'*Anisops sardea*, 1 lot de *Ranatra fusca* et 2 lots de *Microvelia sp* ont été ana-

Tableau 2. Composition spécifique et effectifs des macro invertébrés aquatiques prélevés de mai à août 2007 dans la mare permanente à Sokrogo dans le District sanitaire de Tiassalé/Côte d'Ivoire.

Famille	Genre/Espèce	Effectif	Pourcentage
Baetidae	<i>Cloeon sp.</i>	13	2,20
Chironomidae	<i>Chironomus sp.</i>	66	11,19
Hydrophilidae	<i>Hydrobiinae sp.</i>	6	1,01
Libellulidae	<i>Urothemis sp.</i>	3	0,51
Corixidae	<i>Micronecta sp</i>	462	78,31
Notonectidae	<i>Anisops sp.</i>	15	2,54
Notonectidae	<i>Anisops sardea</i>	9	1,53
Ranatridae	<i>Ranatra fusca</i>	1	0,17
Veliidae	<i>Microvelia sp.</i>	15	2,54
Total		590	100,00

lysés par la PCR. Trois lots de *Micronecta sp* de la famille des Corixidae (figure 4) ont été suspectés de contenir le génome de *M. ulcerans*, 8,57 %. Ces échantillons étaient référencés de la manière suivante : Sokrogo N°1, Sokrogo N°4 et Sokrogo N°5.

En janvier 2008, trente cinq échantillons de salives issus de 35 *Diplonchus sp* (figure 5) prélevés ont fait l'objet d'analyse par PCR. Un échantillon s'est révélé contenir le génome de *M. ulcerans*, soit 2,85 %.



Figure 4. *Micronecta sp* Corixidae) vue dorsale, grossissement 3,5 x 10, taille : 5 à 7 mm.



Figure 5. *Diplonchus sp* (Belostomatidae). Vue dorsale (grossissement 1,5 x 10), taille : 20 à 25 mm.

Tableau 1. Cas d'ulcère de Buruli notifiés de novembre 2004 à novembre 2007 au centre de santé de Sokrogo dans le district sanitaire de Tiassalé.

Formes cliniques	Nombre de cas		Motif de sortie			
	GSS	GAS	SCAM	PST	DUB	
Papule (P)	03	03	00	00	00	00
Nodule (N)	24	23	00	01	00	00
Placard (Q)	19	16	00	01	02	00
Œdème (E)	08	02	01	03	01	01
Ulcère (U)	45	17	06	05	17	01
Atteinte osseuse (O)	00	00	00	00	00	00
Mixte sans ulcère (MSU)	02	02	00	00	00	00
Mixte avec ulcère (MAU)	11	02	00	02	04	02
Total	112	65	07	12	24	04

GSS = Guéri sans séquelle – GAS = Guéri avec séquelle – SCAM = Sortie contre avis médical

PST = Pansement - DUB = Décès des suites de l'ulcère de Buruli.

Discussion

L'UB sévit de façon endémique à Tiassalé et particulièrement à Sokrogo où la présente étude a été réalisée. Les activités dans ce village sont essentiellement agricoles. Cent douze cas d'UB ont été notifiés dans le centre de santé de Sokrogo de novembre 2004 à novembre 2007. En effet, l'ONG, MAP International contribue au dépistage et à la prise en charge des cas de l'UB dans l'aire sanitaire de Sokrogo. Ainsi, des prélèvements biologiques (écouvillons) sont effectués pour la confirmation des cas. Ce nombre de cas notifiés pourrait être sous estimé étant donné la fréquentation relativement faible des centres de santé par les malades (8). Les populations se rendent peu à l'hôpital, du fait des considérations et de la perception que celles-ci ont de la mala-

die. Ainsi, certains ne reviennent plus à l'hôpital quand il est confirmé qu'ils ont l'UB (12 cas sortis contre avis médical). Soixante cinq cas notifiés ont été guéris sans séquelle. En effet, l'UB peut se guérir effectivement s'il est détecté de façon précoce. Dans la même période, 4 personnes atteintes de l'UB en sont décédées. Le mode transmission de l'UB n'est pas encore tout à fait élucidé mais de grands progrès ont été faits récemment grâce à des études réalisées sur des hémiptères aquatiques dans des zones marécageuses (7). En Afrique, des travaux semblent de plus en plus impliquer des insectes aquatiques dans la transmission de l'UB, notamment des punaises aquatiques, (8-10, 18). Cette étude préliminaire menée en Côte d'Ivoire a permis d'identifier *Micronecta sp*, une punaise aquatique phytophage de la famille des *Corixidae* comme hôte intermédiaire de *M. ulcerans*. Elle a également permis de mettre en évidence une séquence d'ADN dans un échantillon de salive prélevés chez *Diplonychus sp*, une punaise aquatique prédatrice et piqueuse.

Une confirmation de ces premiers résultats reste nécessaire. Pour ce faire, d'autres investigations plus approfondies doivent être menées dans d'autres districts sanitaires endémiques.

Conclusion

L'ulcère de Buruli constitue aujourd'hui un véritable problème de santé publique en Côte d'Ivoire et particulièrement dans le district sanitaire de Tiassalé. Cette pathologie émergente et très invalidante est cause de stigmatisation et parfois d'exclusion sociale. Nos résultats suggèrent une forte suspicion de l'implication des insectes aquatiques dans la transmission de *M. ulcerans* à l'homme en Côte d'Ivoire. Les PCR réalisées sur les broyats et salives ont montré la présence de traces de *M. ulcerans* chez *Micronecta sp* et *Diplonychus sp*. Ainsi, deux punaises d'eau pourraient être considérées comme des hôtes et/ou des vecteurs potentiels de *M. ulcerans*. Des investigations plus poussées, portant sur l'implication effective des punaises aquatiques dans la transmission de *M. ulcerans* à l'homme devraient être menées dans d'autres zones endémiques de Côte d'Ivoire.

Références

1. OMS. Ulcère de Buruli. Infection à *Mycobacterium ulcerans*. *REH* 2004; 79 : 145-49.
2. OMS. Ulcère de Buruli. Infection à *Mycobacterium ulcerans* : atlas des cas déclarés dans le monde. 2004. *REH*; 79; 194-9.
3. OMS. Rapport de la 7^e Réunion du groupe consultatif spécial de l'OMS sur l'ulcère de Buruli. 2004, 4 p.
4. OMS. Ulcère de Buruli : rapport de situation, 2004-2008. *REH* 2008; 17 : 145-56.
5. Perraudin ML, Herrault A, Desbois JC. Ulcère cutané à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli). *Ann Ped* 1980; 27 : 687-92.
6. Olivia M. L'ulcère de Buruli, la « maladie mystérieuse » 2004. <http://www.afrik.com/article/7428.html>.
7. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM. Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 1999; 353 : 986.
8. Kanga JM, Kacou ED. Aspect épidémiologiques de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire : résultats d'une enquête nationale. 2001; 94 : 46-51.
9. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint André JP, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68 : 4623-8.
10. Marsollier L. Ecologie et modèle de transmission de *Mycobacterium ulcerans*, agent étiologique de l'ulcère de Buruli, Thèse de Doctorat Université d'Angers - Chimie et microbiologie de l'eau. 2003; N° 556 : 173 p.
11. Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, André 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 : 935-43.
12. Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, De Weirtd D, Boakya D, Meyers WM et al. Potential role for fish transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) : an environmental study. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 : 5679-81.
13. Ahoua L. Fcteurs de risque de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire : Résultats d'une enquête réalisée en Août 2001. Faculté de Médecine de Créteil Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en médecine, Université Paris Val-De-Marne, 2002. 27 p.
14. Levêque C, Dejoux C, Iltis A. Limnologie du fleuve Bandama, Côte d'Ivoire. *Hydrobiologia* 1983; 100 : 113-41.
15. Dejoux C, Elouard JM, Forge P, Maslin JL. Catalogue iconographique des insectes aquatiques de Côte d'Ivoire. Rapport ORSTOM, Bouaké, n°42. 1981; 178 p.
16. Guimaraes-Peres A, Portaels F, de Rijk P, Fissette K, Pattyn SR, van Vooren JP et al. Comparison of two PCRs for detection of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* 1999; 37 : 206-8.
17. Ross BC, Marino L, Oppedisano F, Edwards R, Robins-Browne RM, Jonhson PD. Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35 : 1696-700.
18. Mosi L, Williamson H, Wallace JR, Merritt RW, Small PL. Persistent association of *Mycobacterium ulcerans* with the West African predaceous insects of the family belostomatidae. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 : 7036-42.