HAL
open science

Punaises aquatiques du Cameroun : biodiversité, phylogéographie et rôle dans l'écologie de Mycobacterium ulcerans, agent étiologique de l'ulcère de Buruli

Solange Meyin a Ebong

▶ **To cite this version:**

Solange Meyin a Ebong. Punaises aquatiques du Cameroun : biodiversité, phylogéographie et rôle dans l'écologie de Mycobacterium ulcerans, agent étiologique de l'ulcère de Buruli. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier; Université de Yaoundé I, 2015. Français. NNT : 2015MONTS273 . tel-02446401

HAL Id: tel-02446401

https://theses.hal.science/tel-02446401

Submitted on 20 Jan 2020

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier et l'Université de Yaoundé I (co-tutelle internationale)

Préparée au sein de l'école doctorale Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre (GAIA) et le Département de Biologie et Physiologie Animale (BPA)

Et de l'unité mixte de recherche Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC) et le Service de Mycobactériologie du Centre Pasteur du Cameroun (CPC)

Spécialité : Microbiologie et Parasitologie

Présentée par Solange MEYIN A EBONG

TITRE DE LA THESE

Punaises aquatiques du Cameroun : Biodiversité, Phylogéographie et Rôle dans l'Ecologie de *Mycobacterium ulcerans,* agent étiologique de l'ulcère de Buruli

Soutenue le 21 décembre 2015 devant le jury composé de

M. Thierry BOURGOIN	Pr1, MNHN Paris (France)	Président
M. Christophe THEBAUD	Pr1, UPS Toulouse (France)	Rapporteur
Mme Carine BROUAT	CR1, IRD Montpellier (France)	Examinateur
Mme Sara EYANGOH	CL1, CPC Yaoundé (Cameroun)	Examinateur
M. Philippe LE GALL	CR1 IRD Paris-sud (France)	Examinateur
M. Jean-François GUEGAN	DR0 IRD Montpellier (France)	Directeur
M. Flobert NJIOKOU	Pr.UYI Yaoundé (Cameroun)	Co-directeur
M. Albert SAME EKOBO (invite)	Pr.UYI Yaoundé (Cameroun)	Co-directeur

UNIVERSITE DE MONTPELLIER ET L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER ET L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I

Discipline : Microbiologie / Parasitologie

École Doctorale : Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre (GAIA) et le Département de Biologie et Physiologie Animale (BPA)

Présentée et soutenue publiquement par

Solange MEYIN A EBONG

Le 21 décembre 2015

Punaises aquatiques du Cameroun : Biodiversité, Phylogéographie et Rôle dans l'Ecologie de Mycobacterium ulcerans, agent étiologique de l'ulcère de Buruli

Devant le jury composé de :

M. Thierry BOURGOIN	Pr1, MNHN Paris (France)	Rapporteur
M. Christophe THEBAUD	Pr1, UPS Toulouse (France)	Rapporteur
Mme Carine BROUAT	CR1, IRD Montpellier (France)	Examinateur
Mme Sara EYANGOH	CL1, CPC Yaoundé (Cameroun)	Examinateur
M. Philippe LE GALL	CR1 IRD Paris-sud (France)	Examinateur
M. Jean-François GUEGAN	DR0 IRD Montpellier (France)	Directeur
M. Flobert NJIOKOU	Pr.UYI Yaoundé (Cameroun)	Co-directeur
M. Albert SAME EKOBO	Pr.UYI Yaoundé (Cameroun)	Co-directeur (invite)

Résumé

Une des 17 maladies tropicales négligées déclarées par l'OMS, l'ulcère de Buruli constitue aujourd'hui un réel problème de santé publique en Afrique centrale et de l'Ouest où il sévit dans près de 30 pays. Cette maladie touchant principalement les populations des zones enclavées reste un mythe car l'on ne connaît pas aujourd'hui le mode de transmission exacte de la bactérie responsable, *Mycobacterium ulcerans*, à l'humain. Une meilleure connaissance de l'écologie de ce bacille constitue pourtant un levier important tant pour apporter des informations concernant sa transmission que pour lutter contre ce fléau. Fortement soupçonnés de jouer un rôle d'hôtes ou de vecteur de *M. ulcerans*, certains taxons de punaises aquatiques semblent être prédisposés de par leur écologie ou leur comportement à héberger le bacille voire à le transmettre. Les travaux que nous présentons ici visent dans un premier temps à identifier sur des bases anatomiques complétées par des approches moléculaires les différents taxons de punaises aquatiques présents au Cameroun. Au-delà de proposer une clé d'identification d'espèces et une classification des punaises aquatiques du Cameroun reposant sur des séquences nucléotidiques, nous discutons du rôle important joué par l'écologie de certaines espèces de punaises dans la transmission de *M. ulcerans*. Les différentes approches comparatives et biostatistiques développées dans ce travail de thèse étayent l'hypothèse que certains taxons de punaises aquatiques, et notamment issus des familles Belostomatidae et Naucoridae, acquièrent la mycobactérie à partir de l'environnement en partageant des habitats (fréquentation de la végétation aquatique émergée) où le bacille prolifère, et en se nourrissant de proies, comme des mollusques ou de petits poissons, eux-mêmes contaminés par la bactérie. La capacité de vol chez les punaises aquatiques n'apparaît pas faciliter l'acquisition de *M. ulcerans* mais semble impliquée dans la dissémination de ce dernier en contaminant de nouveaux environnements. Au terme de cette thèse, nous discutons de l'écologie des communautés de punaises aquatiques et de leur macroécologie au Cameroun, et examinons l'importance de l'échantillonnage comme élément important de tout travail de recherche en écologie et évolution des maladies infectieuses.

Mots-clés : Ulcère de Buruli, *Mycobacterium ulcerans*, Afrique, Hétéroptères aquatiques, transmission infectieuse, taxonomie, systématique, écologie des communautés, approches comparatives, biogéographie, macroécologie, échantillonnage.

Abstract

One of 17 neglected tropical diseases declared by WHO, Buruli ulcer is now a real public health problem in Central and West Africa, where it occurs in nearly 30 countries. This disease mainly affecting people in remote areas remains a myth because we don't know today the exact mode of *Mycobacterium ulcerans* transmission, the causal agent to humans. A better understanding of the ecology of this bacillus is an important lever to make the information about its transmission as the fight against this scourge. Strongly suspected to playing a role of host or vector of *M. ulcerans*, some aquatic bugs' taxa seem to be predisposed by their ecology or behavior to harbor the bacillus or to convey it. The works presented here are intended firstly to identify on anatomical bases complemented by molecular approaches different taxa of aquatic bugs present in Cameroon. Beyond proposing an identification key of taxa and classification of aquatic bugs in Cameroon based on the nucleotide sequences, we discuss the important role of the ecology of some taxa of aquatic bugs in the transmission of *M. ulcerans*. Different comparative and biostatistics approaches developed in this thesis support the hypothesis that some taxa of water bugs, especially from the Belostomatidae and Naucoridae families acquire the mycobacteria from the environment by sharing habitats (attendance of emerged aquatic vegetation) where the bacilli proliferate, and feeding on prey such as molluscs and small fish themselves contaminated with the bacteria. The flight capacity of aquatic bugs do not appear to facilitate the acquisition of *M. ulcerans* but seems to be involved in their dissemination by contaminating new the environments. At the end of this thesis, we discuss the ecology of aquatic bugs' communities and their macroecology in Cameroon, and examine the importance of sampling as an important component of any research work in ecology and evolution of infectious diseases.

Keys words: Buruli ulcer, *Mycobacterium ulcerans*, Africa, aquatic Heteroptera, Infectious transmission, Taxonomy, systematic, community ecology, comparative approaches, biogeography, macroecology, sampling

Remerciements

Cette thèse réalisée en co-tutelle entre les universités de Yaoundé I et de Montpellier a été une grande expérience scientifique et personnelle qui m'a offert des séjours merveilleux dans plusieurs villes et institutions à la quête de nouvelles technologies. C'est l'occasion pour moi d'exprimer ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont œuvré à la bonne réalisation de cette thèse en m'apportant leur soutien financier, technique et moral pendant toutes ces années :

- Au Département Soutien et formation au Sud de l'IRD qui m'a octroyé une bourse de thèse sans laquelle ces séjours n'auraient jamais eu lieu ;
- Au Dr. Guy Vernet, Directeur Général du Centre Pasteurdu Cameroun qui a accepté m'accueillir dans son illustre établissement ;
- Au Dr Sara Eyangoh, Directeur Scientifique du Centre Pasteur du Cameroun pour m'avoir ouvert les portes du Service de Mycobactériologie, pour son appui financier et logistique à travers les projets "JEAI", "ANR Buruli", ses efforts consentis à la réussite de cette lourde tâche. Docteur Sara comme nous aimons vous appeler très affectueusement, soyez rassurée de mon immense gratitude.

Je remercie le personnel du Centre Pasteur du Cameroun et en particulier le service de Mycobactériologie pour la sympathie et l'enthousiasme qui ont toujours régné entre nous ainsi que leur soutien moral. Ceci a été une source de motivation surtout lors de mes multiples descentes sur le terrain en vue de la collecte des échantillons. Cette fastidieuse tâche a été menée à bien avec la collaboration des différents chauffeurs notamment Joachim Ossomba, Raphael Bekada et Jean Claude Rimiss.

Le Docteur Philippe Le Gall grâce à ses multiples années d'expérience sur le terrain, m'a été d'une importance capitale dans la réalisation des collectes de données sur le terrain. Sincèrement merci.

Ma reconnaissance va à l'endroit du personnel du Centre IRD de Montpellier et singulièrement à tous les membres de l'UM «MIVEGEC» dont l'amitié et la collaboration m'ont permis de passer d'inoubliables séjours à Montpellier aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Merci à mon Directeur de thèse Jean-François Guégan pour ses conseils multiformes, sa disponibilité permanente et son attention soutenue à diriger ce travail de thèse. Jean-François, trouvez ici l'expression de ma très profonde gratitude. Vous avez été secondé dans cette tâche par François Chevenet, Guillaume Castel et Gabriel Garcia à qui j'adresse mes sincères remerciements.

Merci à mes co-directeurs de thèse Albert Samé Ekobo et Flobert Njiokou pour leur accompagnement tout au long de ce travail.

Je remercie les membres de l'équipe "Diversité, Ecologie et Evolution des Insectes Tropicaux" (DEEIT) en l'occurrence le Professeur Myriam Harry et Elsa Petit pour leur franche collaboration dans l'analyse des séquences de punaises aquatiques. A Laure Kaiser-Arnaud pour son affection dont elle a fait montre à mon égard.

A tout le personnel du Département Systématique et Evolution du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris en particulier Eric, Laurent, José, Armand pour leurs précieux conseils et Dominique Pluot-Sigwalt qui a disposé de son temps pour mon initiation à la taxonomie des Hétéroptères et à la rédaction scientifique. Ma très chère Dominique, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés.

A tous les membres du consortium EXTRA-MU pour leurs discussions enrichissantes et leurs contributions à la réalisation de ce travail: Gaétan Texier, chef Service Epidémiologie (Centre Pasteur du Cameroun) en reconnaissance de ses conseils concernant l'analyse des données de terrain ; Laurent Marsollier et Estelle Marion de l'ISERM (Angers) pour leur initiation à l'étude des punaises aquatiques et aux techniques de détection de la mycobactérie chez ces dernières ; Jordi Landier avec qui nous avons commencé l'aventure sur l'ulcère de Buruli à Bankim ; Arnaud Fontanet de l'Institut Pasteur de Paris pour la coordination du consortium. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Merci à mes parents Mr. Ebong Hilarion, Mme EBong Marie et à tous mes frères et sœurs pour leur soutien et affection. A mon fiancé Hubert pour sa patience, sa tendresse et son affection à nul autre pareil. A nos enfants Nelly Charnelle et Audrey Cyrielle Ida ainsi qu'à mes neveux Atik et Narcisse pour leurs encouragements.

Une attention particulière est accordée à tous les membres de jury, qui malgré leur emploi de temps saturé ont bien voulu m'accorder de leur temps surtout à la veille des fêtes de fin d'année pour l'évaluation de ce travail.

Sommaire

Remerciements 1
Sommaire..... 6
Liste des figures 9
Liste des tableaux 9
INTRODUCTION GENERALE 10
I-L'ulcère de Buruli 11
I.1-Généralités 11
I.2-*Mycobacterium ulcerans*, aspects environnementaux 13
II-Généralités sur les Hétéroptères ou punaises aquatiques 14
Objectifs de la thèse 16
I-Objectif général 16
II-Objectifs spécifiques 16
CHAPITRE 1. Description morphologique des Hétéroptères (punaises) aquatiques et sub-aquatiques du Cameroun 18
I-Les différents taxons identifiés au Cameroun 19
II-L'infra-ordre des Nepomorpha 20
2.1- Les Belostomatidae (Leach, 1815) du Cameroun 21
2.2 - Les Corixidae (Leach, 1815) du Cameroun 26
2.3- Les Micronetidae ( ) du Cameroun 28
2.4 - Les Naucoridae (Fallen, 1815) du Cameroun 28
2.5- Les Nepidae (Latreille, 1802) du Cameroun 30
2.6 - Les Notonectidae (Leach, 1815) du Cameroun 33
III-L'infra-ordre des Gerromorpha 36
3.1 - Les Gerridae (Leach, 1807) 37
3.2 - Les Hydrometridae Bilberg, 1820 du Cameroun 40
3.3 - Les Mesovelliidae (Douglas et Scott, 1867) du Cameroun 41
3.4 - Les Veliidae (Amyot et Serville, 1843) du Cameroun 42
3.5 - Les Hebridae du Cameroun 43

CONCLUSION 44
Article 1: Survey of Water Bugs in Bankim, a New Buruli Ulcer Endemic Area in Cameroon 45
Introduction 46
Materials and Methods 47
Results 50
Discussion 51
Conclusion 54
References 55
CHAPITRE 2. Approche intégrative (morphologique et moléculaire) de la délimitation des espèces de punaises aquatiques du Cameroun 57
Article 2: Molecular species delimitation and morphology for the determination of aquatic and sub-aquatic bugs (Heteroptera) potentially implicated in the Buruli ulcer in Cameroon 59
Introduction 62
Materials and Methods 63
Results 66
Discussion 75
Conclusion 76
References 77
CHAPITRE 3. Caractérisation phylogéographique et biogéographique des punaises aquatiques du Cameroun 83
Article 3: *Mycobacterium ulcerans* acquisition by aquatic Heteropterans (or bugs) is driven by complex interplays between biogeographical and ecological characteristics 84
Introduction 87
Materials and methods 87
Results 91
Discussion 103
Conclusion 104
References 105
Article 4: Ecological traits of water bugs facilitate their acquisition of *Mycobacterium ulcerans* in Africa 111
Introduction 113
Materials and methods 115
Results 121
Discussion 122

Conclusion 124
CHAPITRE 4. Introduction à l'étude de la biodiversité et à la macroécologie des punaises aquatiques du Cameroun 131
Introduction 132
Matériel et Méthodes 133
Résultats..... 138
Discussion 150
Références 152
CONCLUSION GENERALE 158
Reference 161
Annexes 169
Articles associés 182

Liste des figures

Figure 1. Différentes lésions causées par l'infection à *M. ulcerans*
Figure 2. Répartition géographique de l'ulcère de Buruli dans le monde en 2014
Figure 3. Schéma du circuit de transmission de *M. ulcerans* de l'environnement à l'homme
Figure 4. Tâches réalisées pendant la thèse (MU = *M. ulcerans*)
Figure 5. Différents taxons identifiés dans nos collections
Figure 6. Principaux caractères morphologiques (face dorsale et antennes) des 4 genres de Belostomatidae collectés au Cameroun
Figure 7. Mâles de Belostomatidae portant les œufs sur leur dos
Figure 8. A : les œufs chez les Corixidae
Figure 9. Principaux caractères des 3 genres de Naucoridae : vue dorsale
Figure 10. Principaux caractères des genres de Nepidae
Figure 11. Œufs de Nepidae
Figure 12. Œufs et ponte de Notonectidae
Figure 13. Œufs et ponte chez les Gerromorpha

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre de morphotypes identifiés dans chaque famille d'Hétéroptères aquatiques récoltés au Cameroun.
Tableau 2 : Morphotypes et espèces de Nepomorpha récoltés au Cameroun. L'astérisque indique les espèces précédemment citées du Cameroun dans la littérature.
Tableau 3: Morphotypes et espèces de Gerromorpha récoltées au Cameroun. L'astérisque indique que l'espèce a été déjà citée du Cameroun dans la littérature.

INTRODUCTION GENERALE

I-L'ulcère de Buruli

I.1-Généralités

L'ulcère de Buruli est une maladie tropicale négligée causée par la bactérie environnementale *Mycobacterium ulcerans*. La maladie doit son nom "ulcère de Buruli" au Comté Buruli aujourd'hui district de Nakasongola une région de l'Ouganda où les premiers cas d'ulcère de Buruli ont été rapportés en Afrique [1-5] *M. ulcerans* produit la mycolactone, une toxine caractéristique ayant un pouvoir immuno-dépressif qui est responsable de la destruction massive de la peau et des tissus mous chez l'humain. Après une incubation de quelques semaines à plusieurs mois, apparaissent les formes initiales de l'infection qui se présentent sous l'aspect de nodule, de plaque, d'œdème ou de papule qui peuvent disparaître au bout de 8 semaines d'antibiothérapie (combinaison rifampicine et streptomycine) [6]. En l'absence de traitement, ces lésions initiales évoluent en ulcérations cutanées à caractère indolore malgré leur extension parfois importante. Ces ulcérations à bords décollées caractéristiques et à fond nécrotique peuvent s'étendre sur tout le membre ou sur une large partie du thorax (figure 1). L'extension des lésions peut entraîner des complications importantes telles que l'atrophie des muscles ou des ostéomyélites à l'origine des incapacités fonctionnelles chez les patients qui sont alors stigmatisés [7,8]. Bien que la maladie soit rarement fatale, les séquelles invalidantes peuvent avoir un impact physique et socio-économique énorme sur les personnes touchées [9].

Afin de réduire au maximum la morbidité et limiter les incapacités, le diagnostic et le traitement précoces sont préconisés. Néanmoins, cette maladie qui touche principalement les populations pauvres des zones enclavées en Afrique centrale et de l'ouest n'ayant pas un accès facile aux soins, l'absence de douleur et les appréhensions locales avec un penchant envers les tradi-praticiens sont à l'origine du diagnostic tardif de la maladie généralement observé ici. Dans cette région, la déclaration des cas n'est pas automatique ; les malades sont souvent identifiés lors des campagnes de dépistages massifs en zones endémiques ou par le biais des relais communautaires. Le dépistage tardif entraîne un temps d'hospitalisation très long entraînant un retard dans la scolarisation et le développement physique, la stigmatisation et la discrimination sociale des malades qui sont essentiellement des enfants de moins de 15 ans [8,10-13]. De plus, les parents sont souvent obligés d'abandonner leurs activités et les autres membres de la famille pour rester à l'hôpital. Cette longue hospitalisation contribue à la pérennisation de la pauvreté constituant ainsi un frein au développement socio-économique des pays endémiques en Afrique (Garchitorena et al., sous presse).

Figure 1. **Différentes lésions causées par l'infection à *M. ulcerans***

(A) Forme nodulaire, (B) lésion ulcéreuse à bord décollé (C) large ulcère en cours de cicatrisation, (D) déformation du membre inférieur résultant de l'atrophie des muscles après la guérison d'un large ulcère

Source : OMS 2000 et 2014

L'ulcère de Buruli est la troisième mycobactériose humaine après la tuberculose et la lèpre [14,15]. Décrit en 1948 à partir de six patients rapportés de la région de Bairnsdale en Australie [16], l'agent responsable de cette maladie a été nommé *Mycobacterium ulcerans* en raison des lésions ulcéreuses qu'il provoque [16]. A la suite de la découverte de cette nouvelle mycobactériose, de nombreux cas sont décrits notamment en Afrique : en 1959, 170 cas sont rapportés du Congo [17], en Ouganda, Clancey, Dodge, Lunn et Oduori (1961) [2] décrivent l'ulcère de Buruli chez 40 patients dont 28 proviennent du Comté de Buruli. Cependant, il est probable que cette maladie soit plus ancienne car en 1897, Sir Albert Ruskin Cook, médecin britannique travaillant à l'hôpital de Mengo à Kampala (Ouganda) décrit plusieurs cas de larges ulcères cutanés aux bords décollés très évocateurs de l'ulcère de Buruli. Depuis les années 80, le nombre de cas, le nombre de foyers et le nombre de pays touchés par cette maladie n'a cessé d'augmenter, essentiellement en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale où la maladie sévit actuellement dans près de 33 pays, alors que le foyer historique Ougandais s'est éteint (Figure 2) [18].

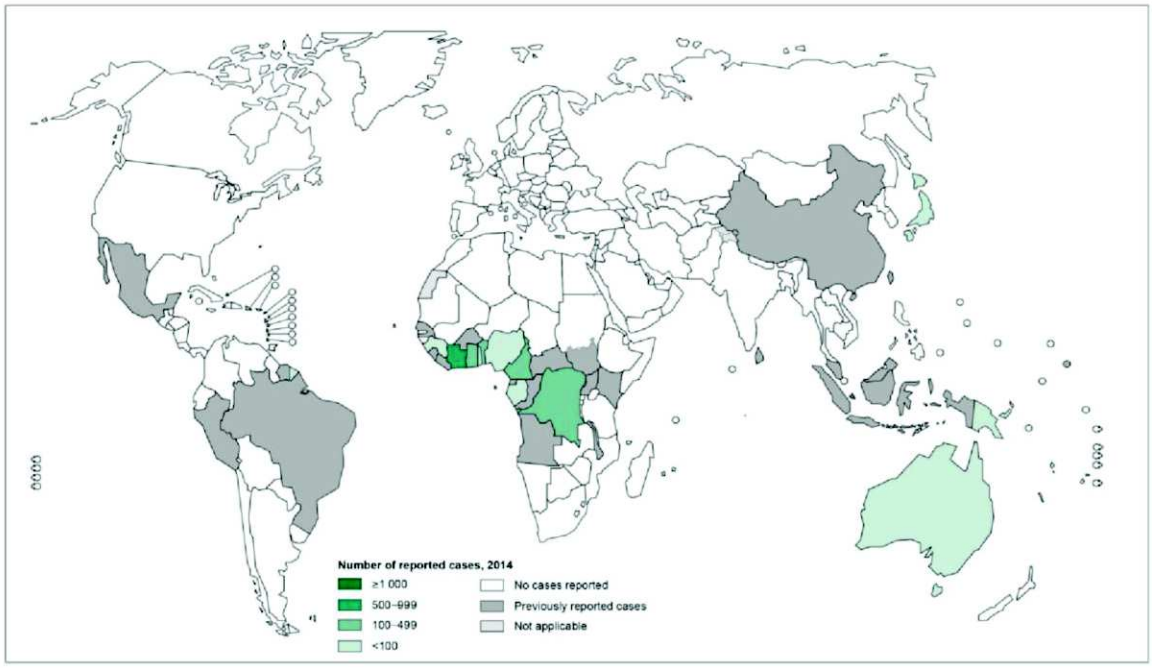


Figure 2. Répartition géographique de l'ulcère de Buruli dans le monde en 2014

Source OMS 2015

I.2-Mycobacterium ulcerans, aspects environnementaux

Malgré la forte mobilisation de la communauté scientifique autour de cette maladie, le mode de transmission exact de la mycobactérie chez l'homme reste mal connu. Cependant, il est établi que la maladie sévit dans des foyers circonscrits situés près des collections d'eau stagnante ou à faible courant et les flambées semblent être liées à des changements environnementaux (déforestation, agriculture, installations hydrauliques) impliquant des eaux de surface [19-24]. En Afrique, les cas d'ulcère de Buruli sont plus fréquents pendant la saison de pluie et l'exposition des populations semble se produire dans les champs agricoles plus ou moins inondés [25-27].

Contrairement aux bacilles responsables de la Tuberculose ou de la Lèpre, il n'y a pas de transmission d'homme à homme de *M. ulcerans* [28,29]. Il est probable qu'il existe plusieurs modes d'entrée du bacille dans le tissu cutané. La transmission du bacille se ferait à travers un traumatisme de la peau. Cependant, une infection expérimentale de *M. ulcerans* sur un modèle de cochon de Guinée n'a pas entraîné le développement des lésions cutanées chez l'animal [30]. Les insectes pourraient également jouer un rôle dans la transmission de la mycobactérie dans certains cas [31-33] mais il semble que ces observations ne sont pas faites dans tous les foyers où il y a transmission [34]. Un modèle expérimental de transmission impliquant les punaises aquatiques de la famille des Naucoridae (Figure 3) a montré un développement des lésions ulcéreuses chez les souris [35]. Mais le rôle de ces insectes comme des vecteurs potentiels, au sens d'une vectorisation semblable à celle de Plasmodium falciparum par Anopheles gambiae est remis en cause dans des études réalisées en Afrique de l'Ouest [36,37]. En Australie, les signatures moléculaires de *M. ulcerans* ont été détectées chez les moustiques [23,38,39]. Dans les foyers

endémiques de l'état de Victoria, les signatures moléculaires de *M. ulcerans* ont ont été détectées dans les fèces des opossums qui sont des petits mammifères arboricoles [40] mais vivant aussi au sol pour s'alimenter. Plusieurs études ont évoqué l'implication des hôtes intermédiaires (Figure 3) dans le cycle de transmission de la mycobactérie [35,41-43]. Gryseels et al. (2012) [44] ont également suggéré une implication probable des amibes mais leur rôle dans la transmission de *M. ulcerans* semble limité [45]. *M. ulcerans* étant une bactérie à croissance lente, il reste très difficile de l'isoler à partir des prélèvements environnementaux ; cependant une seule étude a pu isoler une souche de *M. ulcerans* par la culture des prélèvements environnementaux [32].

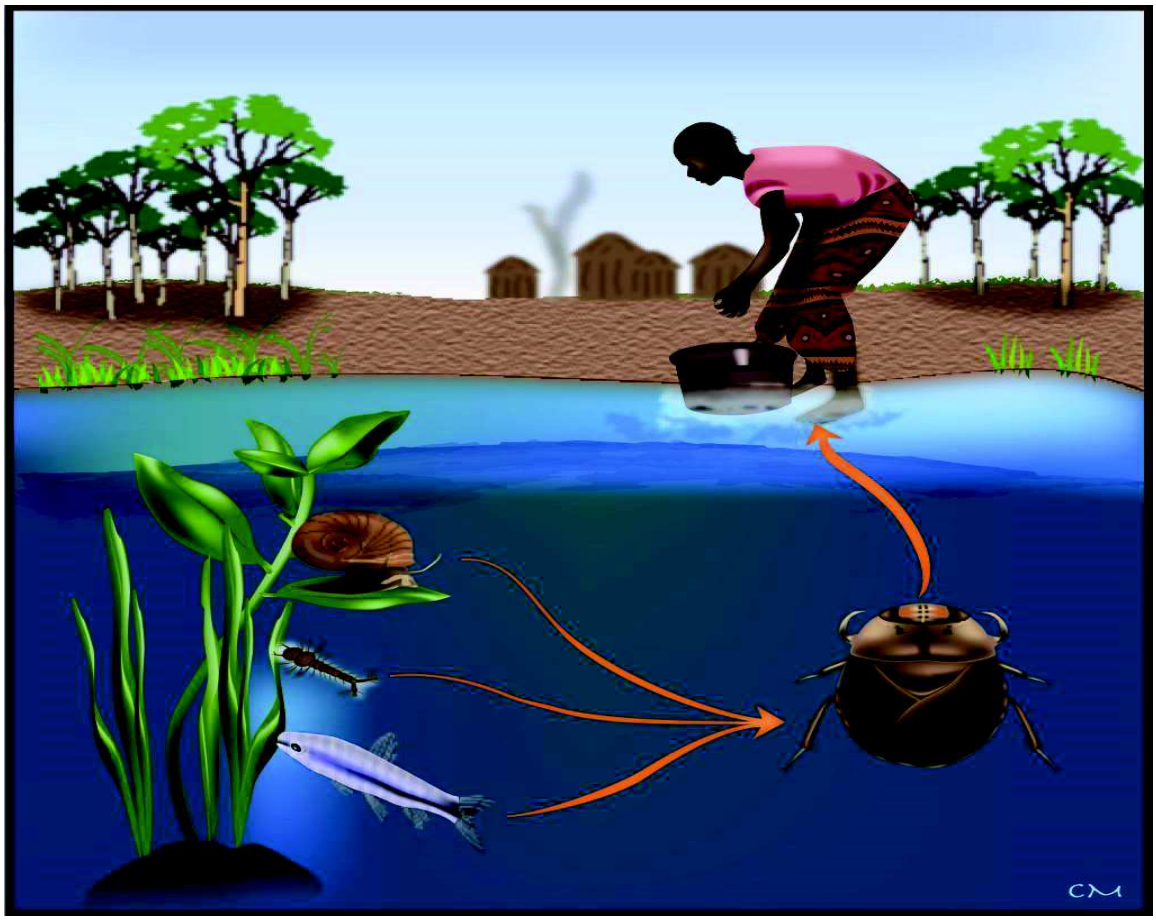


Figure 3. Circuit de transmission de *M. ulcerans* de l'environnement à l'homme

Ce modèle suggère que les mollusques ou poisson se contamineraient au cours de leur repas sur les plantes aquatiques portant le biofilm de *M. ulcerans* [46]. 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. Source : Marsollier et al. 2007

II-Généralités sur les Hétéroptères ou punaises aquatiques

Les Hétéroptères aquatiques et sub-aquatiques sont regroupés dans trois infra-ordres : Nepomorpha, Gerromorpha et Leptodomorpha [47]. On connaît actuellement 4810 espèces d'Hétéroptères aquatiques appartenant à 343 genres et 23 familles distribués mondialement sauf

l'antarctique, montrant aussi une grande abondance sous les tropiques [48,49]. En dehors des coléoptères, les Hétéroptères sont les seuls insectes qui ont su développer des adaptations à la véritable vie aquatique à l'état adulte [50]. Environ 10% des espèces d'Hétéroptères connues se recrutent dans divers milieux aquatiques. Cette vie aquatique est accompagnée d'une parfaite adaptation leur permettant d'exploiter tous les avantages que leur procure ce type d'environnement. En fonction de ces adaptations, on rencontre les Nepomorpha dans l'eau, les Gerromorpha à la surface de l'eau et les Leptopodomorpha qui affectionnent les bordures humides des points d'eau sans être de véritables formes aquatiques. Les Hétéroptères, en particulier les Hétéroptères aquatiques, ont fait l'objet de plusieurs études anciennes. De nombreux chercheurs ont effectué des voyages et missions dans le monde entier dans le but d'étudier la systématique, la biologie, l'écologie et la répartition géographique des espèces récoltées : mission J. Millot 1953-1954 [51], mission scienifique de l'OMO [52], mission zoologique de l'I.R.S.A.C. en Afrique orientale [53].

L'Afrique de même que le Cameroun n'ont pas été épargnés de ces voyages (voyage de M. P.-P. Grassé en Afrique Occidentale Française en 1934 ; voyage de M. L. Chopard en Côte d'Ivoire en 1938-1939 ; mission J. Carrayon au Cameroun en 1947…). Les échantillons récoltés au cours de ces missions scientifiques ont été étudiés en détail, principalement par Raymond Poisson [54-58] qui en a fait une très belle et unique collection complète d'Hétéroptères africains et paléarctiques actuellement conservée au "Smithsonian Institution" à Washington. On note la présence de quelques spécimens de Nepomorpha et Gerromorpha d'Afrique identifiés par ce même auteur dans les collections du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Mais, malgré ces travaux, un catalogue des espèces d'Hétéroptères aquatiques d'Afrique n'a pas été dressé. Néanmoins des taxons tels que quelques genres et les principales espèces ont été décrits ou citées de l'Afrique et en particulier du Cameroun voir (voir tableau 6 chapitre 2). Après cette époque de Poisson, grand entomologiste, très peu de taxonomistes se sont intéressés à la faune d'Hétéroptères afro-tropicale [49,59-61] si bien que les connaissances sur la biologie, l'écologie et la taxonomie de ces insectes restent très peu documentées dans cette région.

OBJECTIFS DE LA THESE

I-Objectif général

Nos travaux de thèse se sont focalisés sur l'étude de la faune de punaises aquatiques du Cameroun suspectées d'être des hôtes et/ou des vecteurs potentiels de *M. ulcerans*, agent étiologique de l'ulcère de Buruli dans un modèle expérimental réalisé au laboratoire. Plusieurs autres études in natura ont aussi détecté la présence de la mycobactérie chez ces insectes aquatiques (voir Chapitre 3). Cependant, une étude véritable de l'implication des punaises aquatiques dans l'écologie et la transmission de *M. ulcerans* nécessite une bonne connaissance de ces insectes, et notamment à savoir lesquels par leur écologie, leur biologie ou leur comportement sont les plus à même de participer au cycle de transmission de cette bactérie.

Le but principal de cette thèse a été de clarifier la taxonomie et la systématique des punaises aquatiques du Cameroun, de mieux comprendre leur biogéographie et la distribution de leurs communautés d'espèces.

II-Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques se déclinent en trois axes complémentaires présentés ci-dessous. L'un des objectifs (voir Chapitre 3) contribue au débat sur l'existence d'une transmission vectorielle par ces mêmes punaises. Initialement inscrit dans un programme interdisciplinaire soutenu par l'ANR (ANR EXTRA-MU), une partie de notre travail n'a cependant pas pu être accomplie. Des problèmes liés à la caractérisation moléculaire de *M. ulcerans*, essentiellement dus à des contaminations, ne nous ont pas permis de caractériser individu par individu, et ce pour chaque espèce de punaise aquatique pour chacun des 10 sites étudiés, la présence ou l'absence de la mycobactérie. Nous avons eu cependant recours à une approche statistique comparative (voir Chapitre 3) qui étudie le lien entre la présence de *M. ulcerans* et les punaises aquatiques au niveau de la famille.

La recherche telle que nous l'avons développée dans le présent document se décline comme suit :

- Eclairer la taxonomie des punaises aquatiques présentes au Cameroun et proposer une clé d'identification basée sur des critères morphologiques, et développer une systématique moléculaire basée sur le marqueur moléculaire de la cytochome-oxydase ;

- Déterminer les traits écologiques des punaises aquatiques qui favorisent l'acquisition de la mycobactérie chez certains taxons. Ces traits écologiques tels que le type d'habitat, les habitudes alimentaires et la capacité de vol ont été déterminés sur la base de la littérature scientifique existante sur les punaises aquatiques et traités par des approches comparatives ;

- Analyser la composition et la structure des communautés de punaises aquatiques du Cameroun ainsi que leur phylogéographie, basées sur l'utilisation des séquences de COI ; au-delà,

proposer des scénarios explicatifs de colonisation spatiale par les espèces de punaises et la mycobactérie.

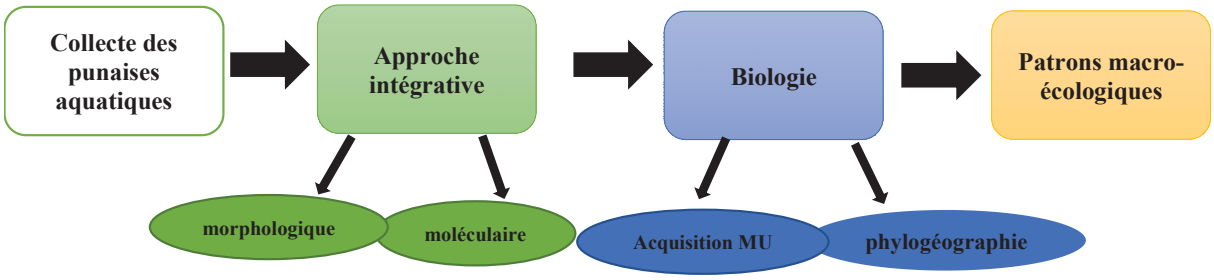


Figure 4. Tâches réalisées pendant la thèse (MU = *M. ulcerans*)

L'ensemble du travail de thèse contribue à une meilleure connaissance des interactions entre les punaises aquatiques, du moins certains de leurs taxa, et *Mycobacterium ulcerans* tout en renouvelant la taxonomie et la systématique de ces Hétéroptères pour le continent africain.

CHAPITRE 1

Description morphologique des Hétéroptères (punaises) aquatiques et subaquatiques du Cameroun

Dans ce premier chapitre, nous abordons la reconnaissance des différents taxa d'Hétéroptères aquatiques que nous avons récoltés pendant les deux campagnes d'échantillonnage réalisées en 2011 et 2012-2013, dans les zones endémiques et non endémiques à l'ulcère de Buruli au Cameroun sur la base de leurs critères morphologiques. La taxonomie, science de la classification des organismes vivants, a pour objectif de décrire ces organismes et de les regrouper en entités appelées taxa (familles, genres, espèces) afin de les identifier, les nommer et les classer. Elle complète la systématique qui est la science qui organise le classement des taxons et s'intéresse à leurs relations.

Ce travail est fondamental puisqu'il est la base sur laquelle s'appuieront toutes nos recherches ultérieures. Il fût long et difficile pour plusieurs raisons. 1) La faune des Hétéroptères aquatiques du Cameroun, comme celle de l'Afrique tropicale en général, est encore mal connue malgré les travaux anciens de Poisson [54,56,62-67]. 2) La faune afro-tropicale manque de spécialiste; aucun chercheur dans le Monde ne s'est actuellement spécialisé dans l'étude de cette faune. 3) Il n'existe pas de catalogue général qui aurait permis d'avoir une vue d'ensemble des espèces déjà connues au Cameroun, en Afrique et dans le Monde. 4) La bibliographie, concernant cette faune est énorme et très dispersée.

I- Les différents taxons identifiés au Cameroun

Dans le matériel récolté nous avons identifié 10 familles d'Hétéroptères aquatiques dont 5 appartiennent à l'infra-ordre des Nepomorpha et 5 à celui des Gerromorpha (Popov, 1971) (Figure 5).

Dans un premier temps, dans chaque famille, nous avons identifié des morphotypes. Au total, 63 morphotypes dont 49 à l'état adulte, 14 à l'état juvénile ont été identifiés (Tableau 1). Ces morphotypes ont été ensuite identifiés au niveau du genre et de l'espèce ou de la sous-espèce. Les tableaux 2 et 3 montrent la correspondance entre morphotypes et espèces. Il y a moins d'espèces que de morphotypes pour les raisons suivantes : chez certains Gerromorpha, on a des formes aptères, macroptères et même brachyptères au sein d'une même espèce; les mâles et les femelles d'une même espèce peuvent aussi être très différents ; enfin, les formes juvéniles ne sont pas souvent assimilables à une espèce.

Parmi les 49 morphotypes adultes, nous avons identifié 54 espèces et sous-espèces appartenant à 25 genres (Tableaux 2 et 3). Tous les spécimens ont pu être identifiés au niveau de l'espèce et de la sous-espèce, à l'exception de plusieurs exemplaires pour lesquels nous ne sommes pas allé plus loin que le genre ; soit parce que le genre en question est encore mal défini ou mal connu ; soit parce qu'il s'agit d'une espèce encore inconnue et non décrite ; soit encore parce que les mâles sur lesquels se fonde l'identification étaient absents de notre matériel. Dans ce travail, 14 espèces ou sous-espèces sont donc identifiées provisoirement sous le nom d'un genre et d'un numéro spécifique.

Cette faune de 54 espèces montre une remarquable diversité : forme, taille, morphologie, biologie, comportements, adaptations, modes de vie ; tout est différent d'une famille à l'autre, voire d'un genre à l'autre. Nous examineront successivement les différents taxons (infra-ordres, familles, genres) et donner pour chaque famille leurs particularités morphologiques, biologiques et comportementales. Ces données sont tirées principalement des travaux de : [47-50,54, 56-58, 6165, 67-74].

On trouvera en annexes (1 et 2) les clés dichotomiques permettant d'identifier les familles et sous-familles ainsi qu'un bref aperçu de leurs caractères diagnostiques.

Tableau 1 : Nombre de morphotypes identifiés dans chaque famille d'Hétéroptères aquatiques récoltés au Cameroun.

Familles	Morphotypes		Total
	Adultes	Juvéniles	
Belostomatidae	7	4	11
Corixidae	2	0	3
Naucoridae	4	1	5
Nepidae	5	2	7
Notonectidae	9	4	13
Gerridae	8	1	9
Hydrometridae	4	0	4
Mesoveliidae	3	1	4
Veliidae	6	0	6
Hebridae	1	0	1
Total	49	14	63

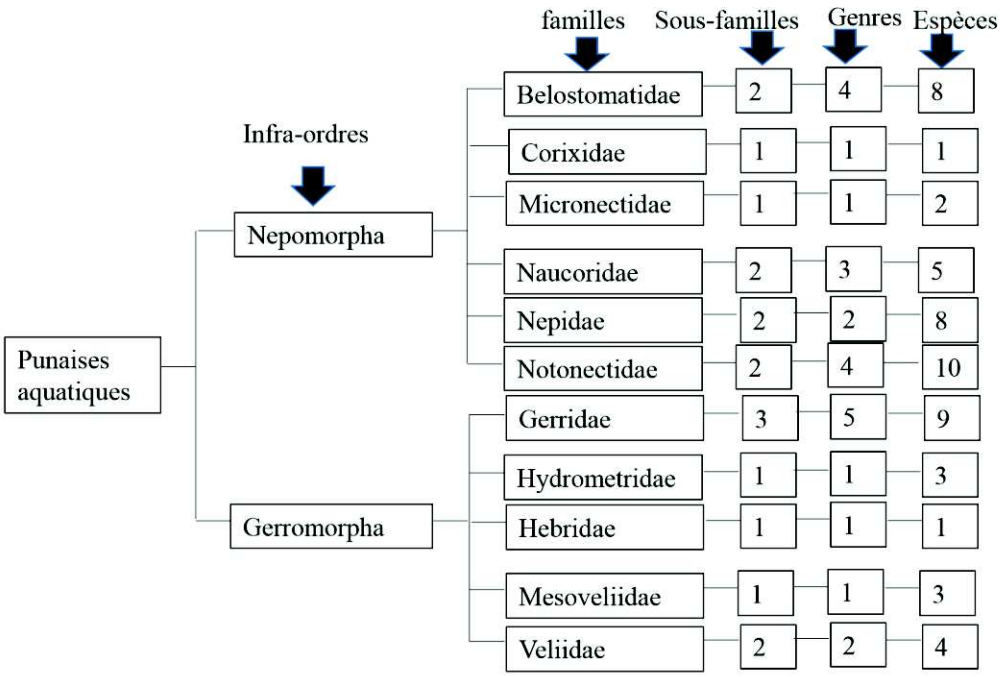


Figure 5. Différents taxons identifiés dans nos collections: Infra-ordres (2), familles (11), sous-familles (18), genres (25) et espèces (54).

II- L'infra-ordre des Nepomorpha

Popov (1971) a regroupé les Hétéroptères de pleine eau, ou « vraies punaises d'eau », au sein de l'infra-ordre des Nepomorpha. Ils étaient précédemment connus sous le nom de Hydrocorises (Dufour, 1833). En raison de leurs antennes courtes généralement cachées sous les yeux, Fieber (1851) les avait aussi désignées sous le nom de Cryptocérates. Une clé d'identification donnée en annexe 1 permet d'identifier les 6 familles et les sous-familles de Nepomorpha présentes au Cameroun : Belostomatidae, Corixidae, Micronectidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae. Les principaux caractères (diagnose) de cet Infra-ordre sont présentés en annexe 2a et ceux des différentes familles en annexes 2b – 2f.

Tableau 2 : Morphotypes et espèces de Nepomorpha récoltés au Cameroun. L'astérisque indique les espèces précédemment citées du Cameroun dans la littérature.

	Sous-familles	Morphotypes	espèces identifiées
Belostomatidae	Belostomatinae	B1a	**Appasus grassei grassei* [55]
		B1b	**Appasus nepoides* (Fabricius, 1803)
		B2	**Appasus procerus procerus* (Gerstaecker, 1873)
		B3	**Appasus ampliatus* Bergroth, 1890
		B4	**Limnogeton fieberi* Mayr, 1953
		B5	*Hydrocycius nanus* Montandon, 1907
		B6	**Hydrocyrius colombiae comlombiae* (Spinola, 1852)
	Lethocerinae	B7	**Lethocerus cordofanus Mayr, 1953*
Corixide	Corixinae	Co1	*Sigara (Tropocorixa)* sp.
	Micronectinae	Co2	*Micronecta* sp.1
		Co3	*Micronecta* sp.2
Naucoridae	Naucorinae	Na1	*Naucoris obsuratus obsuratus* Montandon, 1913
		Na2	*Macrocoris flavicollis flavicollis* Signoret, 1861
		Na2	*Macrocoris laticollis laticollis* Montandon, 1909
	Laccocorinae	Na3	**Laccocoris discus* Poisson, 1949
		Na4	*Laccocoris limigenus limigenus* (Stål, 1865)
Nepidae/Nepinae	Nepinae	Nm1	*Laccotrephes dilatatus* (Montandon, 1895)
		Nm1	**Laccotrephes fabricii* Stål, 1868
		Nm2	*Laccotrephes calcaratus* Montandon, 1898
		Nm2	*Laccotrephes armatus* Montandon, 1898
		Nm3	**Laccotrephes latimanus* Montandon, 1909
		Nm3	*Laccotrephes sp*
Nepidae/Ranatrinae	Ranatrinae	Nr1	**Ranatra bottegoi* Montandon, 1903
		Nr2	*Ranatra (Capensis) congoensis* Poisson, 1949
Notonectidae	Anisoponae	No1	**Anisops (Micranisops) apicalis* Stål, 1855
		No1	**Anisops (Micranisops) parvulus* Brooks, 1952
		No2	*Anisops (s. str.) kampalensis* Hutchinson, 1928
		No3 ♂	**Anisops (s. str.) sardeus sardeus* Herrich-Schaeffer, 1849
		No5 ♀	
		No4	*Anisops (s. str.) jaczewskii* Hutchinson, 1928
			Anisops sp.
		Mor6 = Mor7	*Enithares glauca* Bolivar, 1879
		No8	*Enithares sobria* Stål, 1855
		No9	**Nychia marshalli* (Scott, 1872)
		NoL 4	**Neonychia congoensis congoensis* Hungerford, 1946

La famille des Belostomatidae a été divisée en 3 sous-familles (Belostomatinae, Lethocerinae, Horvatinae). Polhemus et Polhemus (2007) [49] ont recensé environ 160 espèces de Belostomes dans le monde dont 23 en Afrique tropicale. Les espèces de cette famille sont capables de voler et sont attirées la nuit par la lumière.

Au Cameroun, nous avons identifié deux sous-familles, 4 genres, 8 espèces et sousespèces, sur un total de 23 espèces connues en Afrique tropicale. La distinction des 2 sousfamilles est relativement aisée tandis que les genres et les espèces sont difficiles à identifier (Tableau 2). On trouvera dans l'annexe 1 la clé d'identification de la famille et des deux sousfamilles et en annexes 2b la diagnose de cette famille.

2.1.1- Sous-famille des LETHOCERINAE (Lauck & Menke, 1961)

2.1.1.1- Genre Lethocerus (Mayr, 1853).

Diagnose du genre. Corps de taille forte, allongé pouvant atteindre 90 mm de long; 2e et 3e articles antennaires avec une projection latérale et le 4e article avec 2 projections ; tarses antérieurs terminés par une griffe; tibia et tarse des pattes postérieures fortement comprimés, minces et plus aplatis que les tibias et tarses des pattes intermédiaires et les 2 paires de pattes sont terminées par 2 griffes; nervures des hémélytres non ramifiées (Figure 6A & C).

Ce genre est cosmopolite et il est l'unique genre de la sous-famille ; il renferme les espèces les plus grandes des Hétéroptères aquatiques rencontrées au Cameroun. Une seule espèce a été identifiée.

– *Lethocerus cordofanus* Mayr, 1953. Espèce assez commune, présente dans toutes les zones de collectes retenues pour l'étude (sauf Buéa, Santchou et Tibati). Déjà signalée du Cameroun dans la ville de Batouri [57]. Essentiellement récoltée au piège lumineux, cette espèce est numériquement peu abondante. Elle est distribuée dans toute l'Afrique tropicale de l'Afrique centrale au sud du Sahara, du Golfe de Guinée à la Somalie [75].

2.1.2- Sous-famille des BELOSTOMATINAE (Lauck & Menke, 1961)

2.1.2.1- Genre s Appasus (Amyot & Serville, 1843).

Diagnose du genre. Espèces de taille moyenne (13 - 16 mm) de long ; corps déprimé ovalaire ; tête avec la région interoculaire globalement convexe ou plate ; marge antérieure du pronotum modérément sinuée, marge postérieure sinuée subtronquée et les côtés presque droits ; pattes antérieures avec un fémur légèrement enflé, plus long que le tibia, tarse de 1 ou 2 articles terminé par 2 griffes égales ou inégales ; membrane des hémélytres réduite (Figure 6 E & F).

Ce genre cosmopolite est représenté en Afrique par une dizaine d'espèces (Andersen and Weir, 2004). Il renferme les plus petites espèces des Belostomes rencontrés au Cameroun. Quatre espèces appartenant à ce genre ont été identifiées.

– *Appasus grassei grassei* [55]. Sous-espèce assez commune, présente dans cinq de nos zones de collecte (Abong-Mbang, Bamenda, Bankim, Garoua, Tibati). Déjà signalée de la région Bamoun au Cameroun [54] et du Nigéria [60]. Récoltée autant au piège lumineux qu'à l'épuisette, cette espèce est numériquement assez abondante.

– *Appasus nepoides* (Fabricius, 1803). Espèce très commune, présente dans toutes nos zones de collectes. Déjà signalée de la région Bamoun au Cameroun [54] et du Nigeria [60]. Espèce récoltée en très grand nombre autant au piège lumineux qu'à l'épuisette.

– *Appasus procerus procerus* (Gersteacker, 1873). Sous-espèce assez commune, présente dans six zones de collectes, (Abong-Mbang, Akonolinga, Bamenda, Mbalmayo, Santchou, Tibati). Déjà signalées de la région Bamoun au Cameroun [57] et du Nigeria [60]. Espèce assez abondante, récoltée autant au piège lumineux qu'à l'épuisette.

– *Appasus ampliatus* Bergroth, 1890. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes. Déjà connue de Batouri [57]. Espèce assez abondante récoltée autant au piège lumineux qu'à l'épuisette.

2.1.2.2- Genre Hydrocyrius Spinola, 1850.

Diagnose du genre. Taille généralement forte à très forte 50 à 70 mm de long, corps déprimé et large ; à tête bombée ; pronotum plus large en arrière ; lobes latéraux des articles 2 et 3 des antennes très longs, s'étendant jusqu'à, ou presque jusqu'à, la pointe de l'article terminal ; pattes antérieures avec un fémur dilaté, tibia et tarse aplatis latéralement, portant 2 griffes inégales ; membrane des hémélytres larges avec des nervures ramifiées formant de nombreuses petites cellules (Figure 6 B & D).

Ce genre est propre à l'Afrique et Madagascar [71]. Deux espèces ont été récoltées et identifiées.

– *Hydrocyrius nanus* Montandon, 1907. Espèce peu commune, présente dans trois zones de collectes (Bamenda, Bankim, Garoua). Espèce très peu abondante récoltée uniquement au piège lumineux. Signalée aussi du Congo Brazza ou Kinshasa, Tanganyika et Guinée occidentale ou équatoriale [61].

– *Hydrocyrius colombiae colombiae* Spinoloa, 1852. Sous-espèce assez commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa, Santchou, Tibati). Déjà collectée à Ebolowa et à Batouri par Carayon [57]. Espèce assez abondante, récoltée autant au piège lumineux qu'à l'épuisette.

2.1.2.3- Genre Limnogeton (Mayr 1853).

Diagnose du genre. Espèces de grande taille, 46 à 57 mm de long ; distinctes par leur forme plus large et les pattes grêles, non aplaties ; pattes antérieures non ravisseuses, articles des tarses étroits et allongés, le dernier portant 2 griffes réduites ; pronotum fortement transverse présentant

une suture entre les marges antérieures et postérieures ; membrane des hémélytres très réduite et veinée (Figure 6 G & H).

Ce genre africain a été révisé récemment [76]. Les espèces s'attaqueraient exclusivement aux escargots d'eau douce. Une espèce a été identifiée.

– *Limnogeton fieberi*. Espèce très rare présente dans deux zones de collecte (Garoua et Mbalmayo). Déjà citée de Batouri [57]. Espèce très peu abondante récoltée essentiellement au piège lumineux. Elle est aussi signalée de Palestine, Egypte, Soudan, Cameroun, de l'Afrique Centrale [76].

2.1.3-Particularités biologiques des Belostomatidae

Cette famille comprend les espèces les plus grandes (40 à 110 mm de long) de tous les insectes aquatiques. Les individus possèdent un siphon caudal rétractile provenant du tergite 8 chez l'adulte. Cet appareil intervient dans la respiration en captant l'air atmosphérique qui est ensuite emmagasiné sous les ailes permettant ainsi à l'insecte de respirer quand il est sous l'eau. Les Belostomes colonisent toutes les collections d'eau douce mais les espèces du genre Lethocerus préfèrent les eaux stagnantes. Bien qu'ils soient de très bons nageurs, la plupart sont des pêcheurs sédentaires qui se perchent sur les plantes aquatiques immergées et attendent leurs proies qu'ils saisissent à l'aide de leurs pattes antérieures ravisseuses. Ils sont tous carnivores et se nourrissent de diverses proies (larves d'autres insectes aquatiques, mollusques,…) ; les espèces géantes du genre Lethocerus s'attaquent aux vertébrés aquatiques tels que les têtards, les petites grenouilles et les petits poissons et sont souvent considérés comme des ravageurs d'écloseries de poissons [77]. La majorité des Bélostomes ont un seul cycle de reproduction biologique pendant lequel la femelle dépose les œufs (10 à plus de 100 œufs par ponte) sur le dos du mâle qui les soigne jusqu'à éclosion (Figure 7A & B). En effet, les mâles portant les œufs les maintiennent humides, les exposent à l'air et les protègent contre les prédateurs. Les espèces du genre Lethocerus pondent leurs œufs sur les plantes aquatiques émergées à la surface de l'eau où ils sont collés en rangées adjacentes formant des lots dont la moyenne est de 1 à plusieurs dizaines (Figure 7C). Le mâle reste dans l'eau à la base du lot d'œufs et peut de temps en temps sortir pour les arroser.

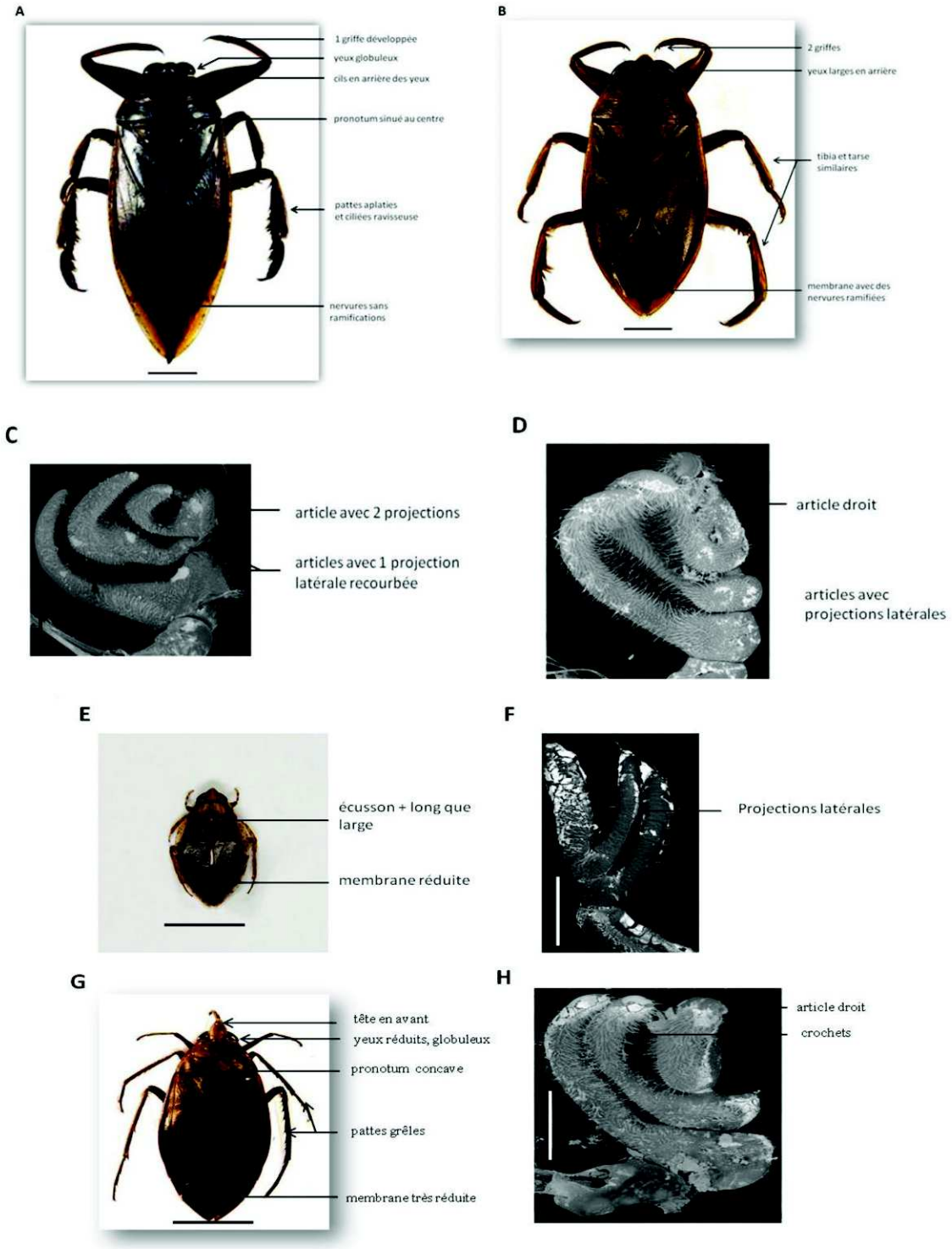


Figure 6. Principaux caractères morphologiques (face dorsale et antennes) des 4 genres de Belostomatidae présents au Cameroun. A, C : *Lethocerus cordofanus* ; B, D : *Hydrocyrius colombiae colombiae* ; E, F : *Appasus ampliatus* ; G, H : *Limnogeton fieberi*

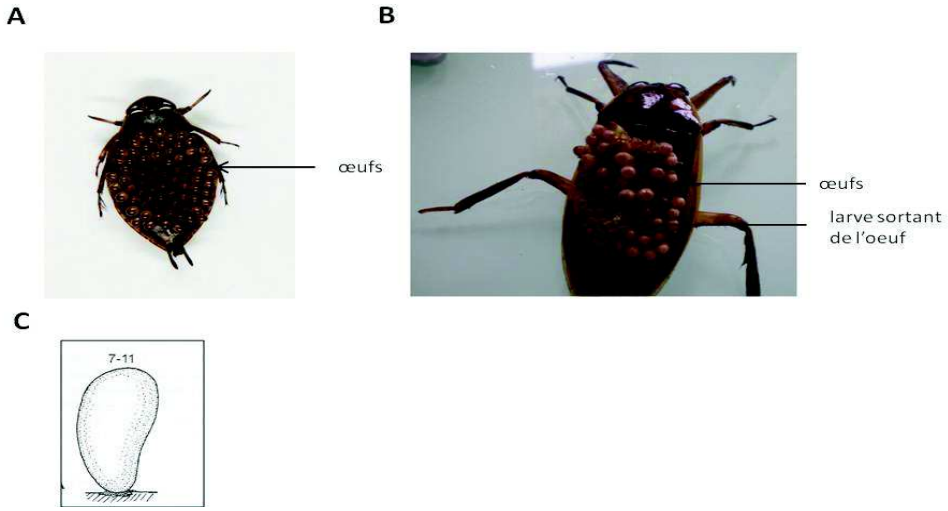


Figure 7. Mâles de Belostomatidae portant les œufs sur leur dos. A : lots des œufs ; B : éclosion montrant une larve qui sort de l'œuf ; C : œuf de Lethocerus fixé à un support (d'après Andersen & Weir, 2004 modifié)

2.2 - Les Corixidae (Leach, 1815) du Cameroun

Hungerford (1948) a divisé les Corixidae en six sous-familles dont trois se recrutent en Afrique [61]: les Corixinae, les Micronectinae et les Stenocorixinae. On connaît actuellement environ 35 genres et 607 espèces de Corixidae dans le monde, dont 111 espèces afro-tropicales [49]. Les espèces de cette famille sont capables de voler et sont attirées la nuit par la lumière.

Au Cameroun, nous avons récolté des spécimens appartenant aux deux premières sous-familles. La plupart des espèces de Corixidae sont très variables, les genres souvent mal définis, et par conséquent la famille est encore assez mal connue du point de vue de la taxonomie. Souvent, seuls les mâles présentent des caractères diagnostiques fiables. Nos espèces restent donc identifiées au genre seulement et sont encore en cours d'étude actuellement.

2.2.1- Sous-famille des CORIXINAE Enderlein, 1912

2.2.1.1- Genre Sigara (Fabricius, 1775).

Diagnose du genre. Taille moyenne (5-7 mm) de long ; alternance de traits clairs et noirs sur le pronotum et les hémélytres; forme générale étroite et parallèle ; antennes de 4 articles ; lobes latéraux du pronotum allongés linguiformes ; tibias antérieurs présentant quelques petites épines apicales ; pronotum saillant en arrière et couvrant l'écusson ; hémélytres arrondies à l'apex (Figure 8B).

Le genre, très variable, est représenté dans de nombreuses régions du Monde. En Afrique, il a déjà été signalé en Guinée et au Soudan [61]. Le genre est scindé en plusieurs sous-genres dont le sous-genre Tropocorixa dont nous avons récolté une espèce.

– *Sigara (Tropocorixa)* sp. Espèce assez commune présente dans cinq zones de collectes (Akonolinga, Bamenda, Bankim, Garoua, Mbalmayo). Espèce assez abondante récoltée aussi bien au piège lumineux qu'à l'épuisette.

2.2.2- Particularités biologiques des Corixidae

Les Corises sont des Hétéroptères de petite à moyenne taille vivant dans diverses collections d'eau. Ils sont fréquents dans les eaux lentes ou stagnantes, le plus souvent sur les rives des lacs, mais aussi dans les mares, les ruisseaux et les étangs. Certaines espèces sont présentes dans les eaux salées ou saumâtres. Les Corises se tiennent sur le fond avec lequel elles se confondent. Les espèces vivant dans des mares temporaires peuvent les quitter pour d'autres zones aquatiques, lorsque les conditions deviennent défavorables, comme l'assèchement de la mare, un manque de nourriture ou l'hivernage. Elles s'envolent alors et peuvent parcourir d'assez grandes distances. Les Corises sont phytozoophages, principalement carnivores, elles se nourrissent de petits vers mais apprécient aussi les algues unicellulaires, les algues filamenteuses et les détritus, tels que les débris de plantes au fond des étangs. Les grosses espèces peuvent aussi se nourrir de larves de Diptères (Culicides, Chironomides). Chaque paire de pattes a un rôle précis : les antérieures récoltent la nourriture, les intermédiaires permettent à l'insecte de s'ancrer au substrat pendant la plongée et les postérieures sont nageuses (Figure 8B). Les Corises ont un rostre large, court et très modifié, non piqueur. Les aliments sont mis en pièces grâce à une rangée de dents en scie et des denticules chitineuses présentes dans le pharynx. Pour respirer, l'insecte aborde la surface de l'eau par l'un des côtés du thorax, des mouvements de flexion de la tête chassent l'air dans les cryptes, cet air gagne ensuite les stigmates abdominaux puis le système trachéen. Les œufs présentant des formes diverses sont fixés sur les plantes aquatiques : dans le genre Corixa, ils ont une forme de poire et sont fixés grâce à un disque fixation (Figure 8A). Les larves naissent généralement au début de l'été et lorsque les conditions sont favorables (température), deux générations par an sont possibles chez certaines espèces.

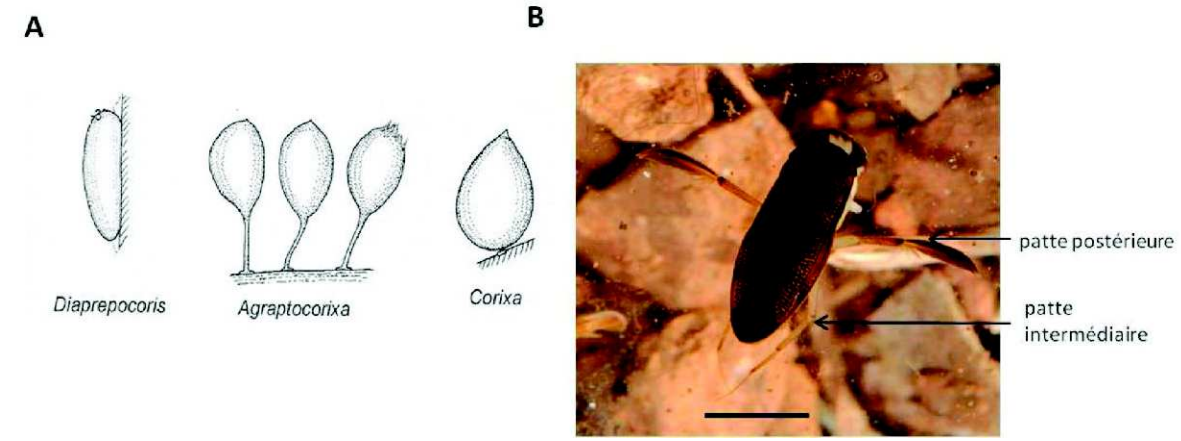


Figure 8.A : les œufs chez les Corixidae ; B : Vue dorsale de Sigara sp en pleine nage
(Source A Poisson in Grassé, 1951 modifié)

2.3- Les Micronetidae du Cameroun

2.3.1- Sous-famille des MICRONECTIANAE Jaczewsky, 1924

2.3.1.1- Genre Micronecta (Kirkaldy, 1897).

Diagnose du genre. Petite taille : 1,5 - 4 mm de long ; teinte marron ; forme générale plus large et plus arrondie latéralement ; antennes de trois articles ; élytres acuminés à l'apex et une gouttière dans sa partie antérieure ; écusson plus large que long ; pronotum très transverse.

Unique représentant de la sous-famille en Afrique et dans les autres régions où il est distribué. Le genre a été signalé du Cameroun, Nigeria, Liberia, Niger et en Côte d'Ivoire [57,61]. [60] l'a également signalé du Nigéria. Carayon in [57] ainsi [57,61] ont récolté quelques spécimens appartenant à ce genre en région Bamoun au Cameroun. Nous avons récolté deux espèces restées non identifiées et encore en étude.

– *Micronecta* sp.1. Espèce assez commune, présente dans huit zones de collectes (Akonolinga, Abong-Mbang, Bamenda, Bankim, Garoua, Mbalmayo, Ngaoundéré, Tibati). Espèce assez abondante récoltée aussi bien au piège lumineux qu'à l'épuisette.

– *Micronecta* sp.2. Espèce très rare, présente dans une seule zone de collecte (Bamenda) et numériquement peu abondante, récoltée uniquement à l'épuisette.

2.4 - Les Naucoridae (Fallen, 1815) du Cameroun

La famille des Naucoridae a été reclassée en 5 sous-familles (Stys & Janson, 1988) dont 2 sont représentées en Afrique soudanienne [57,61]. Les Naucoridae ont une distribution mondiale mais on note une plus grande richesse spécifique en région néotropicale. Actuellement, environ 391 espèces sont décrites dans le monde dont 67 afro-tropicales [49]. Les espèces de cette famille n'ont pas développé la capacité de voler et elles ont été récoltées uniquement à l'épuisette.

Au Cameroun, les 2 sous-familles soudano-africaines ont été récoltées et identifiées Ce sont : les Naucorinae représentés par 2 genres (Naucoris et Macrocoris) et les Laccocorinae représentés par le genre Laccocoris (Tableau 2).

2.4.1- Sous-famille des NAUCORINAE Stal, 1876

2.4.1.1- Genre Naucoris (Geoffroy, 1762).

Diagnose du genre : De taille moyenne environ (6-8 mm) de long ; corps ovalaire pointu en arrière ; relativement convexe dorsalement ; marges internes des yeux droites et légèrement convergentes ; marge postérieure du pronotum légèrement convexe ; pronotum à bord antérieur plus étroit que la base ; écusson plus large que long (Figure 9 A).

Ce genre cosmopolite est prédominant dans les régions tropicales et sub-tropicales. Il a été signalé au Soudan, en Guinée occidentale (Mont Nimba) [61] et au Nigéria [60] Au Cameroun, une espèce a été récoltée et identifiée.

– *Naucoris obsuratus obsuratus* Montandon, 1913. Sous-espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes et numériquement abondante. Connue du Ghana, du Nigéria, du Zaïre [60].

2.4.1.2- Genre Macrocoris Signoret, 1861.

Diagnose du genre. Légèrement plus grand que les précédents environ 10 mm de long ; corps ovalaire, aux contours arrondis ; relativement convexe et arrondi en arrière. Marges intérieures des yeux parallèles et légèrement

concaves ; Pronotum bien plus large que long, à côtés arrondis et bords antérieurs bien plus étroits que les bords postérieurs et concave en arrière ; écusson bien plus large que long (Figure 9B).

Ce genre est endémique au continent africain où il est représenté par neuf espèces décrites [78]. Il a été rapporté du Cameroun et de Côte d'Ivoire (Mont Upemba) [61], du Nigéria par [60] Carayon l'a rapporté de la région Bamoun au Cameroun [57]. Pour notre travail, une espèce a été récoltée et identifiée.

– *Macrocoris flavicollis flavicollis* Signoret, 1861. Sous-espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa, Ngaoundéré), abondante numériquement. Espèce répandue en Afrique centrale et orientale, également signalée de Madagascar et de l'île de Zanzibar [57,58]. [60] l'a rapportée du Nigéria.

– *Macrocoris laticollis laticollis* Montandon, 1909. Sous-espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa, Ngaoundéré), abondante numériquement. L'espèce M. laticollis est présente en Afrique sous différentes formes géographiques. La forme laticollis dont le type provient du Sud Cameroun (collection Schouteden, Musée Royal d'Afrique centrale, Tervuren) a également été signalée de l'Angola [58]

2.4.2- Sous-famille des LACCOCORINAE Stal, 1876

2.4.2.1- Genre Laccocoris Stål 1856

Diagnose du genre : Taille moyenne 8 -11 mm de long ; Corps relativement aplati dorso-ventralement ; marges internes des yeux rectilignes et divergentes ; bords postérieurs du pronotum concaves ; scutellum conique et très réduit ; hémélytres formant un demi-cercle en arrière et membrane bien large (Figure 9C).

Ce genre est connu de l'Afrique et du Moyen-Orient [78]. Il a été signalé du Cameroun et du Congo (Mont Upemba) [61]. Dans notre étude, deux espèces ont été récoltées et identifiées.

– *Laccocoris discus* Poisson, 1949. Espèce assez rare, présente dans deux zones de collectes (Bamenda, Garoua). Déjà signalée du Cameroun [57,61]. Espèce très peu abondante numériquement.

– *Laccocoris limigenis* (Stål, 1865). Espèce rare, présente dans quatre zones de collectes (Bamenda, Bankim, Santchou, Tibati), peu abondante numériquement. Espèce déjà signalée du Cameroun et du Mont Upemba au Congo [57,61] et commune à toute l'Afrique.

2.4.3-Particularités biologiques des Naucoridae

Les Naucoridae sont des insectes de taille moyenne, ils affectionnent les eaux stagnantes ou les ruisseaux à courant lent, riches en végétation aquatique. Ils sont de bons nageurs, mais préfèrent se cacher sous la végétation pour attendre le passage d'une proie qu'ils saisissent et neutralisent avec leurs pattes antérieures ravisseuses. Ce sont de grands prédateurs qui se nourrissent d'amphipodes, d'isopodes, d'autres insectes aquatiques et même de petits poissons. Certaines espèces de Naucoridae sont reconnues pour infliger des piqûres douloureuses chez l'humain. Les nymphes respirent à travers la cuticule et les adultes à travers les stigmates en contact avec une sorte de « chambre à air ». Cette chambre à air est constituée d'une couche d'air

piégée et enfermée par les poils serrés de la face ventrale ; elle apparaît comme un éclat argenté sur la pubescence ventrale [79]. Pour s'accoupler, le mâle est généralement à cheval sur le dos de la femelle. Les œufs sont fixés dans les tissus végétaux sous l'eau, sauf chez Naucoris fabricius qui attache ses œufs sur un substrat à la surface.

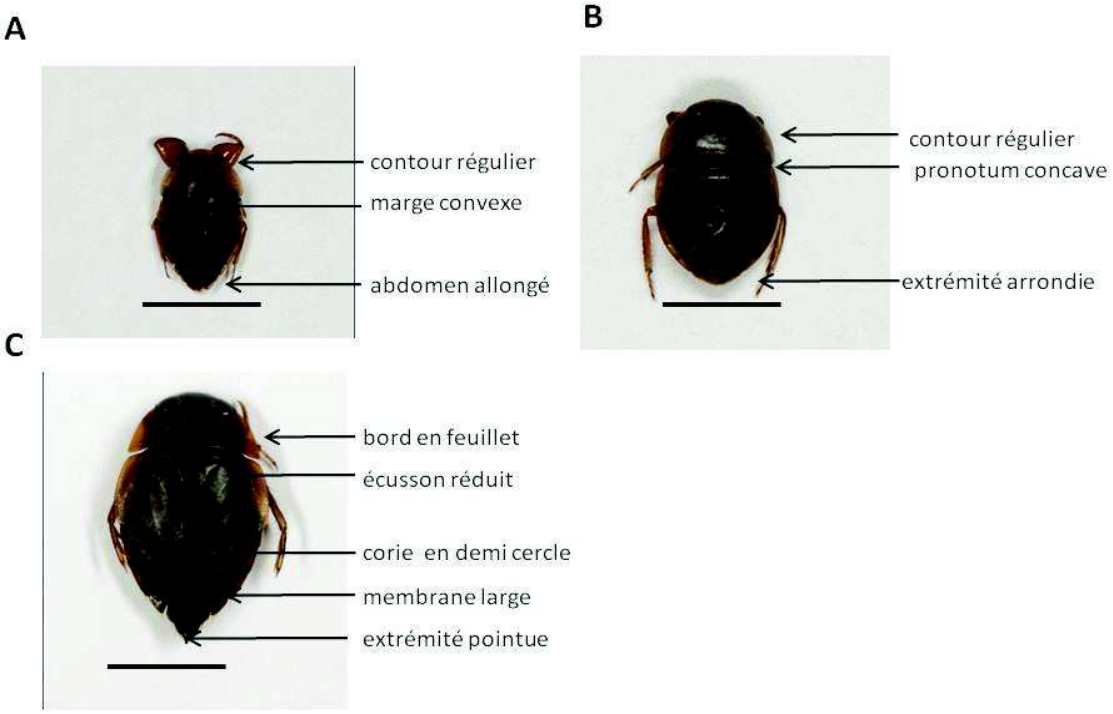


Figure 9. Principaux caractères diagnostiques des 3 genres de Naucoridae : vue dorsale ; A. Naucoris, B. Macrocoris, C. Laccocoris

2.5- Les Nepidae (Latreille, 1802) du Cameroun

La famille des Nepidae est divisée en 2 sous-familles (Nepinae et Ranatrinae) considérées par certains auteurs comme des familles à part entière. On connait actuellement 15 genres et 268 espèces dans le monde dont 84 afro-tropicales [49]. Les espèces de cette famille n'ont pas développé la capacité de voler ; toutes ont été récoltées uniquement à l'épuisette.

Au Cameroun, nous avons identifié deux genres, Laccotrephes (Nepinae) avec 6 espèces, et Ranatra (Ranatrinae) avec 2 espèces (Tableau 2).

2.5.1- Sous-famille des NEPINAE Douglas et Scott, 1865

2.5.1.1- Genre Laccotrephes Stål, 1865.

Diagnose du genre. Corps ovalaire fortement aplati ; tête portant des yeux globuleux et enfoncée dans l'échancrure antérieure du pronotum ; ce dernier aussi long que large, sinué latéralement et fortement échancré en avant de l'écusson ; article unique aux tarses antérieurs pourvus d'une griffe émoussée ; tarses intermédiaires d'un article muni de 2 griffes ; tarses postérieurs de 2 articles portant 2 griffes ; membrane des hémélytres veinée-réticulée (figure 10B).

Ce genre est largement distribué dans les régions tropicales de l'Ancien Monde. En Afrique, il a été rapporté dans de nombreux pays (Sénégal, Guinée, Côte d'Ivoire, Tchad, Niger, Nigéria, Cameroun [61,72]. Nous avons récolté et identifié six espèces.

– *Laccotrephes dilatatus* (Montandon, 1895). Espèce assez commune, présente dans six zones de collectes. En Afrique, déjà signalée d'Oubangui, du Congo et du Gabon (Poisson, 1965).

– *Laccotrephes fabricii* Stål, 1868. Espèce assez commune, présente dans six zones de collectes (Abong-Mbang, Bamenda, Bankim, Garoua, Mbalmayo, Tibati). Il s'agit d'une espèce déjà citée du Cameroun (Batouri, Nkongsamba) [57] et présente dans toute l'Afrique éthiopienne y compris le Sahara [61,72].

– *Laccotrephes calcaratus*. Espèce assez commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Abong-Mbang, Bankim, Tibati). En Afrique, signalée de Somalie, du Congo, du Kenya et de Guinée [72].

– *Laccotrephes armatus* Montandon, 1898. Espèce assez commune présente dans toutes les zones de collecte sauf (Abong-Mbang, Bankim, Tibati). En Afrique, signalée du Congo et de Guinée [72].

– *Laccotrephes latimanus* Montandon, 1909. Espèce peu commune, présente dans quatre zones de collectes (Abong-Mbang, Garoua, Mbalmayo, Santchou). En Afrique, elle a déjà été signalée du Nigeria, Dahomey, Guinée, Congo [72].

– *Laccotrephes* sp. Espèce peu commune présente dans quatre zones de collectes (AbongMbang, Garoua, Mbalmayo, Santchou).

2.5.2- Sous-famille des RANATRINAE Douglas et Scott, 1865

2.5.2.1- Genre Ranatra Fabricius, 1790

Diagnose du genre : Corps cylindrique filiforme et très long (Fig. 10 A) ; tête petite et triangulaire avec des yeux saillants ; pronotum très long et grêle, échancré en avant de l'écusson; élytres complets avec la membrane très courte veinée-réticulée ; tarses intermédiaires et postérieurs de 1article muni de 2 griffes (Figure 10A).

Ce genre est cosmopolite. En Afrique, il a été rapporté du Tchad, du Soudan, de Somalie, du Nord-Cameroun, [61], du Nigéria [60] et du Cameroun [57] Nous avons récolté et identifié deux espèces.

– *Ranatra bottegoi* Montandon, 1903. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Tibati) ; [57] la cite aussi d'Ebolowa. En Afrique, elle est présente en Somalie, au Tchad et au Nord-Cameroun [61,72]

– *Ranatra (Capensis) congoensis* [80]. Espèce assez commune, présente dans six zones de collectes (Akonolinga, Abong-Mbang, Bamenda, Bankim, Garoua, Mbalmayo). Cette espèce a été signalée du Congo (lac Ndalaga, lac Bita, Kalondo) [72].

2.5.3- Particularités biologiques des Nepidae

Les Nepidae, ou scorpion d'eau, sont des Hétéroptères de moyenne à grande taille, ils fréquentent les eaux tranquilles (ruisseaux, étangs, lacs, mares). Ils sont de mauvais nageurs et marchent sur le fond ou se déplacent en grimpant le long des plantes aquatiques. La larve possède 2 sillons ventro-abdominaux aérifères absents chez l'adulte lequel présente un long siphon respiratoire. Pour respirer, l'adulte envoie le siphon à la surface de l'eau pour capter l'air atmosphérique. Ils chassent à l'affût, les pattes antérieures ravisseuses prêtes à saisir la proie qui passe. Ils montrent souvent un phénomène d'immobilisation réflexe en prenant une position rigide, les pattes intermédiaires et postérieures allongées contre l'abdomen, les pattes antérieures étendues en avant de la tête. Les œufs qui sont pourvus de longs filaments (Figure 11) sont introduits dans des fragments de végétaux ou des amas d'algues.

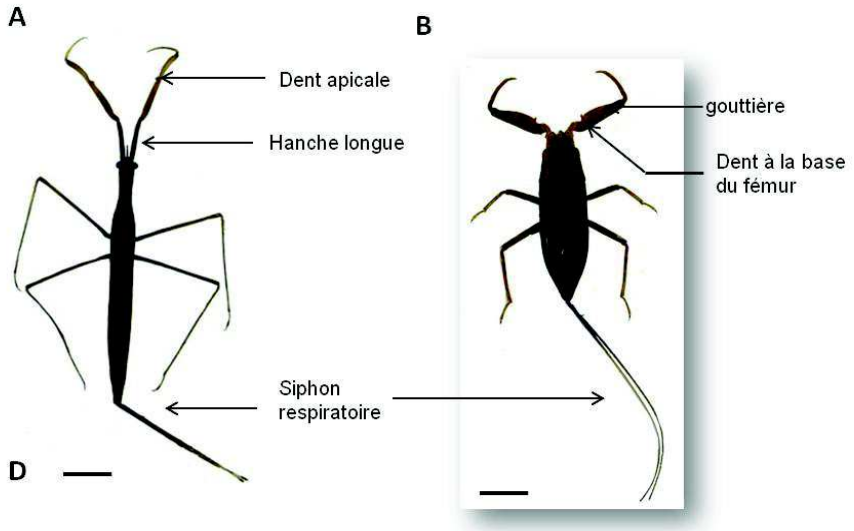


Figure 10. Principaux caractères des genres de Nepidae. A : vue dorsale de Ranatra (forme cylindrique) ; B : vue dorsale de Laccotrophes (forme aplatie dorso-ventralement).

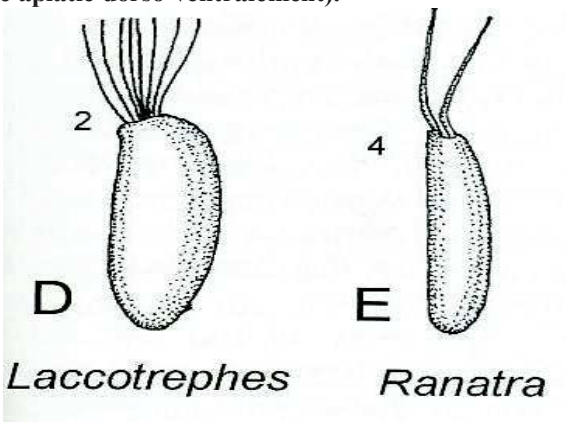


Figure 11. Œufs de Nepidae (Source Adersen & Weir, 2004 modifié)

2.6 - Les Notonectidae (Leach, 1815) du Cameroun

Initialement divisés en quatre sous-familles, les Notonectidae ont été reclassés en deux sous-familles (Hungerford, 1933) : les Notonectinae et les Anisopinae. [49] ont répertorié 11 genres et environ 400 espèces décrites dans le monde, dont 85 en Afrique tropicale. Au Cameroun, des représentants des deux sous-familles ont été récoltés : les Anisopinae représentés par le genre Anisops, et les Notonectinae représentés par les genres Enithares, Nychia et Neonychia. De nombreuses espèces de Notonectes sont capables de voler et sont attirées la nuit par la lumière.

2.6.1- Sous-familles des ANISOPINAE Bueno, 1923

2.6.1.1- Genre Anisops (Spinola, 1837).

Diagnose du genre : Petite à moyenne taille (4 - 10,9 mm) ; Corps élancé très fortement acuminé en arrière ; de grands yeux rapprochés sur le tiers postérieur sans se toucher ; tête des mâles parfois fortement prolongée en cône en avant des yeux ; Pronotum beaucoup moins transverse, angles antéro-latéraux sans fovéoles ; tibias antérieurs de la femelle dépourvus de peigne et tarses comprenant 2 articles comme sur les pattes intermédiaires et postérieures avec des griffes plus grêles que chez le mâle.

Genre distribué dans les régions tropicales et sub-tropicales de l'Ancien monde [77]. Unique représentant de la sous-famille en Afrique, ce genre a été signalé dans toute la région éthiopienne [61] et de différentes régions du Cameroun : Bamoun, cratère du Munoum et du M'bapit également d'Oyem au Gabon [58]. Nous avons identifié dans notre propre étude cinq espèces.

– *Anisops (Micranisops) apicalis*. Espèce commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Garoua et Santchou). Déjà signalée du Cameroun (cratère du M'bapit) (Poisson, 1948).

– *Anisops (Micranisops) parvulus* Brooks, 1952. Espèce commune et numériquement abondante, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Garoua et Santchou). Espèce connue du Congo et du Nigéria [81].

– *Anisops (s. str.) kampalensis*. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes, numériquement abondante, récoltée aussi bien au piège lumineux qu'à l'épuisette. Connue de l'Afrique centrale et orientale [71].

– *Anisops (s. str.) sardeus*. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Ngaoundéré), numériquement abondante et récoltée aussi bien au piège lumineux qu'à l'épuisette. Signalée dans toute la région éthiopienne [61].

– *Anisops (s. str.) jaczewskii* Hutchinson, 1928. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Ngaoundéré), numériquement peu abondante. Signalée du Tanganyika [82], également de Rhodésie (aujourd'hui le Botswana) et du Transvaal [83].

– *Anisops* sp. Espèce assez rare, présente dans deux zones de collectes (Akonolinga, Buéa) et peu abondante numériquement.

2.6.2- Sous-famille des NOTONECTINAE Leach, 1815

2.6.2.1- Genre Enithares Spinola, 1837

Diagnose du genre : Insectes de taille moyenne (6,5 – 11,5 mm) de long ; yeux très gros saillants et distants à bord internes fortement sinués ; Marge antéro-latérale du pronotum avec fovéa et cotés distinctement sinués ; fémurs intermédiaires munis d'un éperon sub-apical ; tarses intermédiaires de 2 articles. Genre propre aux régions chaudes du monde entier.

Ce genre est largement distribué dans le monde en région tropicale (Asie, toute l'Afrique éthiopienne), en Nouvelle-Guinée et en Australie [61,77]. Nous avons récolté et identifié deux espèces.

– *Enithares glauca*. Espèce très peu commune, présente dans une seule zone de collecte (Bamenda) et peu abondante numériquement. Déjà citée du Cameroun (région Bamoun) et du Nord Gabon [58]. Dans la région éthiopienne, elle est présente à peu près partout [61,70].

– *Enithares sobria*. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Santchou), numériquement très abondante et récoltée uniquement à l'épuisette. Déjà citée du Cameroun (région Bamoun) et du Nord Gabon [58]. Signalée de toute la région éthiopienne [61,70].

2.6.2.2- Genre Nychia (Stal, 1858).

Diagnose du genre : Insectes de taille moyenne (5 – 6 mm) de long ; Corps allongé peu convexe sur le dos ; yeux jointifs dans le tiers postérieur ; pronotum transverse et marge antéro-latérale avec fovéas, côtés latéraux bombés ; fémurs intermédiaires dépourvus d'une épine subapicale ; tarses intermédiaires à 1 article bien visible sauf chez le mâle.

Ce genre assez largement distribué dans le Monde est présent sur tout le continent africain [61]. Une espèce a ici été récoltée.

– *Nychia marshalli* : Espèce peu commune, présente dans trois zones de collecte (Akonolinga, Abong-Mbang, Garoua) et numériquement peu abondante, récoltée uniquement à l'épuisette. Déjà signalée du Cameroun (Batouri) [57]. Espèce signalée de la région Paléarctique (Corse) et commune en Afrique [70].

2.6.2.3- Genre Neonychia Hungerford, 1950.

Diagnose du genre : Insectes de taille moyenne (5 – 6 mm) de long ; Corps allongé peu convexe sur le dos ; yeux jointifs dans le tiers postérieur ; Pronotum transverse et marge antéro-latérale sans fovéas, côtés latéraux droits ; fémurs intermédiaires dépourvus d'épine subapicale ; tarses intermédiaires de 2 articles bien distincts et 1 petit article basal dans les 2 sexes.

Genre signalé au Zaïre et au Togo [61]. Nous avons récolté une espèce.

– *Neonychia congoensis congoensis* Hungerford, 1946. Espèce peu commune, présente dans deux zones de collectes (Akonolinga, Mbalmayo), numériquement peu abondante et récoltée uniquement à l'épuisette. Déjà signalée de Batouri au Cameroun [57]. En Afrique, connue aussi du Congo (lac Onaga) et du Togo [84].

2.6.3- Particularités biologiques des Notonectidae

Les Notonectidae sont des insectes de petite à moyenne taille qui diffèrent des autres insectes aquatiques parce qu'ils nagent sur le dos. Cette particularité leur procure un mode de respiration qui est différent de celui observé chez les autres Nepomorpha. En effet, la source primaire d'oxygène chez ces insectes est constituée par l'air atmosphérique qui est régulièrement renouvelé par exposition de l'extrémité postérieure de l'abdomen à la surface de l'eau. La source secondaire est constituée par l'oxygène dissous dans l'eau qui passe dans les « chambres à air » des stigmates abdominaux, lesquels fonctionnent à la fois par inhalation et exhalation. Ces chambres à air fonctionnent comme de véritables branchies jouant ainsi un rôle hydrostatique pour l'insecte. L'emplacement des chambres à air et la position des pattes postérieures sont les principales raisons pour lesquelles les Notonectidae nagent sur le dos [85]. Les Notonectidae sont présents dans toutes les collections d'eau douce, mais les eaux calmes des piscines, étangs et lacs sont leurs habitats préférés. Tous sont prédateurs et se nourrissent des larves de divers arthropodes aquatiques et, à l'occasion, de petits poissons ou autres vertébrés aquatiques. La proie est saisie à l'aide des pattes antérieures et intermédiaires mais la stratégie de chasse diffère d'un genre à l'autre. Les espèces des genres Enithares et Notonecta restent en attente d'une proie, les pattes antérieures en avant, prêtes à bondir à l'approche d'une proie. Anisops par contre reste stationné en équilibre à la surface de l'eau et attend sa proie. Généralement, les notonectes déposent leurs œufs sur ou dans les végétaux aquatiques ; ceux de Notonecta sont déposés à la surface des débris immergés (figures 12 A-C). Beaucoup de notonectes ont la capacité de voler et sont attirées la nuit par la lumière.

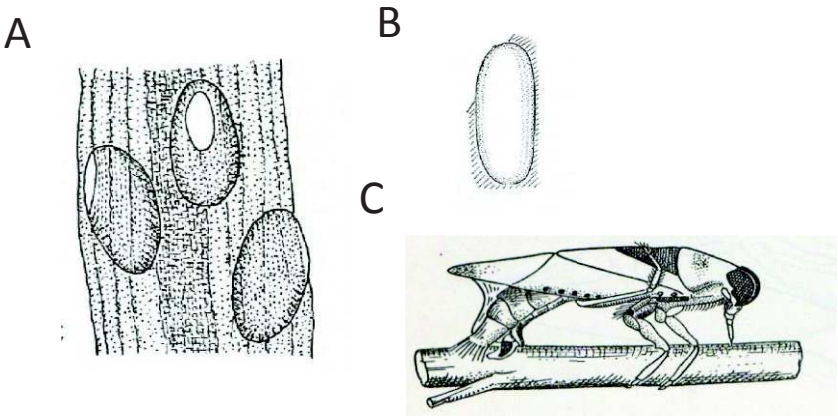


Figure 12. Œufs et ponte de Notonectidae. A, œufs d'Anisops fixés à un support végétal ; B, œuf de Notonecta isolé (d'après Andersen ; 2004 modifié) ; C, femelle de Notonecta glauca insérant un œuf dans une tige de plante aquatique (d'après Poisson, 1951 modifié).

III- L'infra-ordre des Gerromorpha

Tous les Hétéroptères vivants sur la surface de l'eau sont dits semi-aquatiques ou subaquatiques ; ils sont regroupés dans l'infra-ordre des Gerromorpha (Popov 1971). D'abord nommés Amphibicorisae en raison de leur mode de vie à la surface de l'eau, ils ont ensuite été désigné sous le nom de Gymnocerates en raison de leurs antennes longues parfois plus importantes en taille que le reste du corps de l'insecte (Fieber, 1861).

Une clé d'identification donnée en annexe (1b) permet d'identifier les cinq principales familles de Gerromorpha récoltées au Cameroun et traitées ci-dessous : Gerridae, Hydrometridae, Mesoveliidae, Hebridae et Veliidae (Figure 4). Parmi les spécimens de Gerromorpha, nous avons identifié quelques spécimens de la famille des Hebridae, appartenant au genre Hebrus, mais l'espèce reste indéterminée. Vingt espèces et sous-espèces de Gerromorpha ont été identifiées dans ce travail (Tableau 3). Une clé d'identification donnée en annexe 3 permet d'identifier les 5 familles et les sous-familles de Gerromorpha présentes au Cameroun : Gerridae, Hebridae, Hydrometridae, Mesoveliidae, Veliidae. Les principaux caractères diagnostiques de cet Infraordre sont présentés en annexe 4a et ceux des différentes familles en annexes 4b – 4e.

Tableau 3: Morphotypes et espèces de Gerromorpha récoltées au Cameroun. L'astérisque indique que l'espèce a été déjà citée du Cameroun dans la littérature.

Familles	Sous-familles	Morphotypes	espèces identifiées
Gerridae	Gerrinae	Ge1	**Limnogonus (s. str.) Cereiventris* (Signoret, 1862)
		Ge2	*Limnogonus (Limnogoides) poissoni* Andersen, 1973
		Ge3	Limnogonus (Limnogoides) sp
		Ge6	**Limnogonus (Limnogoides) hypoleucus* (Gerstaecker, 1873)
		Ge7	**Limnogonus (Limnogoïdes) intermedius* Poisson, 1941
		Ge4= Ge4'	**Neogeris severini* Kirkaldi, 1900
			*Gerris swakopensis, Stål, 1858
	Halobatinae	Ge5	*Eurymetra* sp
	Rhagadotarsinae	Ge8	**Rhagadotarsus (Caprivia) hutchinsoni* China, 1931
Hydrometridae	Hydrometrinae	H1 = H4	*Hydrometra* sp
		H2	*Hydrometra hutchinsoni* Hungerford & Evans, 1934
		H3	**Hydrometra albolineata* Reuter, 1882
Mesoveliidae	Mesoveliinae	Me1 =Me1'	*Mesovelia* sp1
		Me2	*Mesovelia* sp2
		Me3	**Mesovelia vigittigera* Horvath 1895
Veliidae	Veliinae	Ve1	*Angilia* sp
	Rhagoveliinae	Ve2 =Ve6	*Rhagovelia* sp1
		Ve4	*Rhagovelia* sp2
		Ve5	*Rhagovelia* sp3
Hebridae	Hebrinae	Ve7	*Hebrus* sp

3.1 - Les Gerridae (Leach, 1807)

Les Gerridae sont divisés en 8 sous-familles ; 67 genres et environ 751 espèces sont décrits dans le monde, dont 66 espèces afro-tropicales [49]. Certaines espèces macroptères de Gerridae sont capables de voler et sont attirées la nuit par la lumière.

Nous avons identifié neuf espèces appartenant à cinq genres et trois sous-familles (Tableau 3).

3.1.1- Sous-famille des GERRINAE Bianchi, 1896

3.1.1.1- Genre Gerris Fabricius, 1794

Diagnose du genre : Taille moyenne (6-10mm) de long ; antennes plus courtes que la moitié de la longueur du corps ; 1er articleantennaire plus long quela longueur combinée des 2e et 3e articles ; lobe antérieurdu pronotum muni d'une plaque terne recouverte de poils courts sur la lignemédiane ; Pronotum grand ; Métasternumbien développé ; suturelatérale entre mésothorax et métathorax non distinct ; longueur du 1er segment abdominal à peu près égale à la longueur de 2e segment.

Genre essentiellement paléarctique, s'étendant aussi largement sur le continent africain [48]. En Afrique, il a été signalé du Zaïre, de Guinée, de Côte d'Ivoire [61], du Cameroun [57] et du Nigéria [60].Une seule espèce appartenant à ce genre a été récoltée et identifiée.

3.1.1.2- Gerris swakopensis Stål, 1858

Espèce rare, présente dans une seule zone de récolte (Akonolinga), numériquement peu abondante, et récoltée uniquement à l'épuisette. Déjà citée du Cameroun (Baigom) par [57], elle est aussi présente dans toute l'Afrique éthiopienne [61], et au Nigéria [60].

3.1.1.3- Genre Neogerris Matsumura, 1913

Diagnose du genre : Généralement plus petits que les précédents (6,5mm) ; lobe antérieur du pronotum avec une tache pâle dans une dépression ; Pronotum plus ou moins réduit chez les formes aptères ; tarses des pattes intermédiaires dépourvus de griffes.

Ce genre est rencontré dans toutes les régions tropicales du Monde et il est très présent en Afrique [48]. Une espèce appartenant à ce genre a été identifiée au Cameroun.

– *Neogerris severini* Kirkaldi, 1900 Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa), numériquement très abondante et récoltée aussi bien au piège lumineux qu'à l'épuisette. Elle est présente dans toute l'Afrique éthiopienne et à Madagascar [73].

3.1.1.4- Genre Limnogonus Stål, 1866

Diagnose du genre : Insectes de taille moyenne, 6 à 11,5 mm de long ; corps allongé ; antennes plus longues que la moitié de la longueur du corps ; Pronotum noir avec desbordures jaunes ; 2 taches longitudinales jaunes sur le lobe antérieur du pronotumet une bande médiane longitudinale pâle ; tarses des pattes antérieures de 2 articles dont le 1er est plus court que le 2nd.

Ce genre, révisé par [86] est divisé en deux sous-genres définis par [73]: Limnogonus et Limnogoides. Il est prédominant en régions tropicales, et en Afrique il a été signalé de Guinée [61]. Nous avons identifié cinq espèces et sous-espèces dont quatre du sous-genre Limnogoïdes et une du sous-genre nominal Limnogonus.

– *Limnogonus (s. str.) cereiventris* (Signoret, 1862). Espèce très commune, présente dans toutes les zones de récoltes (sauf Santchou), numériquement abondante, et attirée par la lumière. Déjà signalée du Cameroun (Batouri) [57]. Elle est présente dans toute l'Afrique [57,61,73].

– *Limnogonus (Limnogoïdes) poissoni* Andersen, 1975. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa) et numériquement très abondante.

– *Limnogonus (Limnogoïdes) hypoleucus* (Gerstaecker, 1873). Espèce peu commune, présente dans quatre zones de collectes. Déjà signalée des marais de N'koup et de Batouri au Cameroun [57]. Connue de l'Afrique centrale et du Sud [73].

– *Limnogonus (Limnogoïdes) intermedius* Poisson, 1941. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa et Garoua) ; numériquement très abondante. Déjà signalée des marais de N'koup et de Batouri au Cameroun [57]. Connues de Côte d'Ivoire et du [58, 73] Congo.

– *Limnogonus (Limnogoïdes)* sp. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa). Espèce numériquement abondante.

3.2- Sous-famille des RHAGADOTARSINAE Lundblad, 1933

3.2.1- Genre Rhagadotarsus Breddin, 1905.

Diagnose du genre : Insectes de petite taille, 0,3 à 0,5 mm de long et à corps large ; tête large et courte ; faisant saillie en 9 et 10 prolongés dans un cône cylindrique ; tarses des pattes antérieures munis de griffes en forme de faucille ; fémurs antérieurs allongés.

Ce genre est divisé en deux sous-genres, l'un Rhagadotarsus s.str. n'est présent qu'en Asie du Sud-Est, l'autre Caprivia est propre à l'Afrique tropicale. Une espèce appartenant à ce dernier sous-genre a été identifiée.

– Rhagadotarsus (Caprivia) huntchinsoni China, 1931.Espèce peu commune, présente dans trois zones de récoltes (Abong-Mbang, Mbalamyo, Ngaoundéré) et numériquement peu abondante. Largement distribuée en Afrique : Congo, Soudan, Guinée, Côté d'Ivoire, Afrique du Sud, Nigeria, Zaïre [60].

3.3- Sous-famille des HALOBATINAE Bianchi, 1896

3.3.1- Genre Eurymetra Esaki, 1926

Diagnose du genre : Insectes de petite taille 4.3 à 4.5mm de long ; corps brillant et arrondi ; Pronotum petit ; Métasternum réduit à une petite plaque triangulaire ; suture latérale distincte entre méso- et métathorax ; abdomen petit mais s'étendant au-delà du sommet de la hanche arrière ; segment abdominal non fusionnés ; griffes droites ou en forme de S ; pattes antérieures épaisses.

Ce genre n'est présent que dans les régions tropicales de l'ancien Monde [48]. En Afrique, il est représenté par plusieurs espèces [73]. Quatre espèces [E. aethiops (Distant, 1903) ; *E. pauliani* Poisson, 1941 ; *E. africana* [57]; *E. natalensis* Distant, 1903] ont été signalées du Cameroun par [57, 61]. En Afrique, elle est connue du Nigéria, du Togo et du Zaïre [61]. Une espèce appartenant à ce genre a été récoltée, mais elle reste encore indéterminée.

– *Eurymetra* sp. Espèce très peu commune, présente uniquement à Bamenda. numériquement très peu abondante.

3.4- Particularités biologiques des Gerridae

Insectes de petite ou moyenne taille, ils se déplacent en glissant à la surface des eaux douces, saumâtres ou marines. Cette famille renferme des espèces pélagiques des mers tropicales et sont capables de remonter un fort courant d'eau par des bonds successifs grâce aux mouvements simultanés des pattes intermédiaires et postérieures. Les pattes antérieures bien que non ravisseuses interviennent dans la capture des proies. Ils sont carnassiers et se nourrissent de proies vivantes ou mortes. Les espèces du genre Halobates sont observées sous les tropiques à plusieurs centaines de kilomètres en mer. La femelle fixe ses œufs aux algues, aux plumes flottantes ou aux plumes des oiseaux aquatiques ou encore sur des individus de même espèce [87] (Figure 13) Il existe de nombreux cas de polymorphisme alaire, avec des individus aptères, microptères, brachyptères ou macroptères.

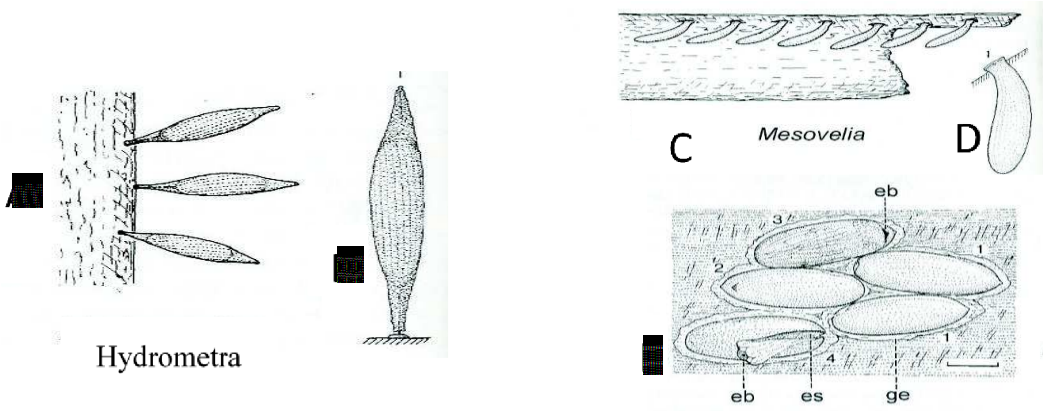


Figure 13. Œuf et ponte chez les Gerromorpha. A-B, Hydrometridae ; C, Mesoveliiae; D-E, Veliidae.
(D'après Andersen 1982, modifié)

3.2 - Les Hydrometridae Bilberg, 1820 du Cameroun

La famille a été reclassée en 3 sous-familles : Hydrometrinae, Heterocleptinae et Limnobatodinae [48, 88]; les deux premières sont rencontrées en région afro-tropicale. Trois espèces récoltées et identifiées au Cameroun appartiennent au genre Hydrometra seul représentant de la sous-famille des Hydrometrinae. Certaines espèces macroptères d'Hydrometridae sont capables de voler et sont attirées la nuit par la lumière.

3.2.1- Sous-famille des HYDROMETRINAE

3.2.1.1- Genre Hydrometra Latreille, 1796

Diagnose du genre : Insectes de 8 – 22 mm de long ; corps très allongé et grêle ; tête plusieurs fois plus longue que large, plus de la longueur combinée pronotum et scutellum ; yeux situés à une certaine distance de la marge antérieure du pronotum ; pas d'ocelles ; hanches intermédiaires plus rapprochées des postérieures ; 2e article des tarses distinctement plus long que le 3e.

Ce genre cosmopolite est le seul représentant de la sous-famille en Afrique tropicale [48]. Il a été signalé de Côte d'Ivoire, de Somalie, d'Ethiopie, du Kenya, du Cameroun [62]. Au Cameroun, *Hydrometra carayoni* a été signalé du Cameroun [57]. Nous avons récolté trois espèces dont l'une reste pour le moment indéterminée au niveau spécifique.

– *Hydrometra huntchinsoni* Hungerford & Evans, 1934. Espèce peu commune, présente dans quatre zones de collectes (Akonolinga, Abong-Mbang, Mbalmayo, Tibati). Numériquement peu abondante, cette espèce n'est pas attirée par la lumière.

– *Hydrometra albolineata* Reuter, 1882. Espèce commune, présente dans six zones de collectes (Akonolinga, Abong-Mbang, Bankim, Mbalmayo, Santchou, Tibati). Numériquement abondante, elle est attirée par la lumière. En Afrique, signalée des régions tropicales du Sud et de Madagascar [89].

– *Hydrometra* sp. Espèce commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Bamenda, Buéa, Ngaoundéré). Numériquement abondante, elle est attirée par la lumière.

3.2.2- Particularités biologiques des Hydrometridae

Hétéroptères à corps linéaire, à longues pattes grêles et à longues antennes. Ils vivent dans les eaux douces calmes ou les bords des rives où ils marchent lentement sur les pierres, les lentilles d'eau, les végétaux aquatiques ou les feuilles flottantes. De mœurs carnassières, Ils se nourrissent de petites proies mortes ou affaiblies qu'ils percent à l'aide de leur long rostre sans toutefois les maintenir avec les pattes antérieures. Les œufs sont coniques aux extrémités dont l'une est pourvue d'un pédoncule terminé par un disque de fixation qui permet à la femelle de les fixer au support. Le développement post-embryonnaire se fait en 5 étapes. La famille est surtout bien représentée sous les tropiques.

3.3 - Les Mesovelliidae (Douglas et Scott, 1867) du Cameroun

Plusieurs auteurs ont discuté de la classification des Mesoveliidae ; néanmoins, les travaux de Andersen et Polhemus (1980) divisent la famille en 2 sous-familles dont une afro-tropicale (Mesoveliinae) représentée par un genre unique. Ce genre à une répartition mondiale et est représenté en Afrique tropicale par 5 espèces [49] Les espèces récoltées ont été capturées à l'épuisette, aucune au piège lumineux.

3.3.1- Sous-famille des MESOVELIINAE Douglas et Scott, 1867

3.3.1.1- Genre Mesovelia Mulsant & Rey 1852

Diagnose du genre : Insectes de petite taille (2 - 3 mm) de long, tête très allongée en avant ; rostre de 3 articles ; Scutelum bien visible chez les formes macroptères qui présente un pronotum bombé sur le tiers postérieur; les 3 lobes du thorax bien distincts et scutellum non visible chez les formes aptères chez qui l'abdomen est divisé en 3 lobes longitudinaux.

Unique représentant de la sous-famille et cosmopolite, le genre est présent sur tout le continent africain [59]. Nous avons récolté et reconnu la présence de trois espèces dont deux restent encore non identifiées.

- *Mesovelia vigittigera*, Horvath 1895.Espèce commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Buéa, Bamenda, Santchou). En Afrique, déjà signalée du Cameroun (Batouri et région Bamoun) et du Gabon [57] ainsi que du Nigéria [60].

- *Mesovelia* sp_1. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Bamenda, Santchou), numériquement très abondante.

- *Mesovelia* sp_2. Espèce très commune, présente dans toutes les zones de collecte (sauf Bamenda, Santchou), numériquement très abondante.

3.3.2-Particularités biologiques des Mesoveliidae

Les Mesoveliidae sont de petits insectes élancés macroptères ou aptères, vivant dans des pièces d'eau calmes riches en végétation aquatique. Ils courent sur les feuilles flottantes, mais ne grimpent pas sur les tiges dressées. Ils se nourrissent de petits animaux morts ou affaiblis. La femelle introduit ses œufs dans les tissus végétaux. Après éclosion sous l'eau, la larve gagne la surface en nageant pour mener une vie uniquement aérienne.

3.4 - Les Veliidae (Amyot et Serville, 1843) du Cameroun

La famille des Veliidae est divisée en 6 sous-familles, 38 genres et environ 600 espèces [47, 48]. Aujourd'hui, 962 espèces appartenant à 61 genres sont connues dans le monde dont 158 espèces afro-tropicales [49]. Apparemment, les espèces de cette famille ne sont pas attirées par la lumière. Tous les individus de notre étude ont été récoltés à l'épuisette.

L'identification des espèces de ce groupe est très complexe. Pour l'instant nous avons pu reconnaître l'existence de 2 genres et de 5 espèces différentes qui ne sont pas encore identifiés au niveau spécifique (Tableau 3).

3.4.1- Sous-famille des VELIINAE China et Usinger, 1949

3.4.1.1- Genre Angilia Stål, 1865

Diagnose du genre : Insectes de taille moyenne (5,8 à 6,6 de mm) de long ; corps court, brun rougeâtre avec destaches blanches sur les hémélytres ; généralement macroptères, très rarement brachyptères ; Pronotum légèrement surélevése terminant par un point situé à l'extrémité du scutellum ; présence d'une grande tache irrégulière entourée de deux à quatre petits points sur la partie apicale de l'aile antérieure ; tous les tarses à trois articles.

La distribution du sous-genre Angilia s.str. est strictement africaine tandis que le sousgenre Adriennella est aussi présent dans le sud-est asiatique. Plusieurs espèces ont été décrites en Afrique dont deux déjà signalées du Cameroun (A. aeterna Hoberlandt, 1951 et A. schoutedeni Poisson, 1942) [57]. Le genre est présent dans de nombreux pays (Zaïre, Congo-Brazza, Togo, Côte d'Ivoire, Ethiopie) [61] et au Nigeria [60]. Une espèce appartenant à ce genre a été identifiée jusqu'au genre.

– *Angilia* sp. Espèce commune, présente dans toutes les zones de collectes (sauf Bamenda, Santchou et Tibati), numériquement peu abondante.

3.4.2-Sous-famille des RHAGOVELIINAE China et Usinger, 1949

3.4.2.1-Genre Rhagovelia Mayr, 1865

Diagnose du genre : Insectes de taille moyenne (4,0 à 5,0 mm) de long ; surface du corps de couleur mat ; ailes antérieures noirâtres ou brunâtres ; macroptères ou aptères et pas de distinction entre le corium et la membrane ; tous les tarses à 3 articles, article basal très court ; tarses intermédiaires munis d'une fente profonde pourvue d'une griffes foliacée.

Ce genre est cosmopolite, et c'est le seul représentant de la sous-famille rencontré en Afrique. Des espèces appartenant à ce genre ont été rapportées de plusieurs pays africains (Côte d'Ivoire, Zaïre, Cameroun, Nigéria [57, 61, 90]. Au Cameroun, [57] cite quatre espèces (R. maculata Distant, 1903 ; R. nigricans Burmeister, 1835 ; R. velia (Latreille 1804) ; R. reitteri Reuter, 1884). Dans notre matériel, nous avons reconnu l'existence de trois espèces différentes appartenant à ce genre mais celles-ci ne sont pas encore identifiées.

– *Rhagovelia* sp_1. Espèce commune, présente dans cinq zones de collectes (Abong-Mbang, Bankim, Buéa, Ngaoundéré, Tibati), numériquement abondante.

– *Rhagovelia* sp_2. Espèce peu commune, présente dans quatre zones de collectes (Buéa, Bamenda, Garoua et Ngaoundéré), numériquement peu abondante.

– *Rhagovelia* sp_3. Espèce peu commune, présente dans quatre zones de collectes (Buéa, Garoua, Mbamayo et Ngaoundéré), numériquement peu abondante.

3.4.3- Particularités biologiques des Veliidae

Les Veliidae sont de petits insectes élancés, macroptères ou aptères, qui se cantonnent dans les eaux calmes ou près des rives des cours d'eau. Ils se rencontrent aussi bien dans les eaux douces que les eaux salées [49]. Seules les pattes intermédiaires interviennent dans la locomotion, les pattes antérieures interviennent dans la capture et le transport de proies à terre où elles sont sucées. La femelle colle ses œufs sur des végétaux immergés des rives.

3.5 - Les Hebridae du Cameroun

Cette famille comprend deux sous-familles et une dizaine de genres dont le cosmopolite Hebrus, qui renferme une centaine d'espèces [48]. Les espèces de ce genre vivent dans les marécages et ruisseaux à faible courant très riches en végétaux aquatiques qui couvrent la surface de l'eau. Certaines espèces se cantonnent entre les feuilles des mousses. Ces minuscules insectes sont bien plus rarement capturés que les Microvelia et les Mesovelia.

3.5.1-Genre Hebrus Curtis, 1833

Ce genre est représenté en Afrique par de nombreuses espèces [91]. Au Cameroun, Poisson [57] a rapporté de Baigom des femelles appartenant à trois espèces probablement nouvelles qui sont restées non étudiées faute de mâles. Nous n'avons récolté que 60 individus appartenant à genre, et restés non identifiés à l'espèce.

Diagnose du genre : Très petits Hémiptères à corps trapu, présence d'ocelles en arrière des yeux, tête plus courte que le pronotum, deux paires de trichobothries sur le vertex, antennes de cinq articles, rostre de quatre articles (les articles 1 et 2 très petits, 3 et 4 très longs), scutellum bien distinct, tarses de 2 articles terminés par des griffes apicales, on observe des formes macroptères et microptères ou sub-microptères, corps spécialement la face ventrale recouvert par un revêtement de poils hydrofuges.

– *Hebrus* sp. Espèce peu commune récoltée dans trois zones de collectes (Abong-Mbang, Akonolinga, Bankim).

CONCLUSION

Cette étude est le premier inventaire de Gerromorpha et de Neopomorpha présents au Cameroun. Certes, les travaux de Poisson [54, 57] avaient déjà fourni des résultats importants en décrivant ou citant 20 espèces appartenant à 11 genres de Gerromorpha et 45 espèces appartenant à 17 genres de Nepomorpha. Nous avons retrouvé 23 espèces déjà citées du pays par cet auteur dont 15 espèces de Nepomorpha et 8 espèces de Gerromorpha sur un total de 39 espèces ou sousespèces ; en supplément, 15 espèces non encore identifiées sont encore à analyser plus en détails. Les clés reportées en annexe 1 et 3 permettent d'identifier les différents taxa discutés dans ce chapitre : familles, sous-familles, genres, espèces. D'autres espèces restent à découvrir certainement car nous n'avons prospecté qu'une partie seulement des collections d'eau du Cameroun, et des régions entières n'ont pas été étudiées, par exemple le bassin du Dja et ses environs. Par ailleurs, les formes immatures (13) n'ont pas pu être identifiées au niveau spécifique.

Dans ce chapitre, les taxons ont été identifiés sur la base de critères morphologiques. Or, on sait que ces critères sont plus ou moins fiables selon les groupes étudiés car souvent ils sont de

type adaptatif ou montrent une très grande variabilité phénotypique. Dans le chapitre suivant, nous proposons une approche moléculaire pour analyser plus finement et donc plus précisément la taxonomie des différentes punaises d'eau récoltées et brièvement présentées ici. En complétant les caractères morphologiques classiques par des caractères moléculaires, et en comparant les résultats obtenus entre les deux types d'approches, nous devrions avoir une image plus précise de ces groupes d'espèces et des affinités des taxa entre eux, c'est-à-dire de leurs relations phylogénétiques. Nous devrions aussi pouvoir affecter les morphotypes immatures, non reconnaissables par la morphologie, aux morphotypes adultes caractérisés doublement sur des bases morphologiques et moléculaires. Il s'agit ici de la taxonomie intégrative des punaises aquatiques.

Article 1: Survey of Water Bugs in Bankim, a New Buruli Ulcer Endemic Area in Cameroon

Solange Meyin A. Ebong, Sara Eyangoh, Estelle Marion, Jordi Landier, Laurent Marsollier, Jean-François Guégan and Philippe Legall

Journal of Tropical Medicine
Volume 2012, Article ID 123843, 8 pages
doi:10.1155/2012/123843

Hindawi Publishing Corporation Journal
of Tropical Medicine
Volume 2012, Article ID 123843, 8 pages
Doi:10.1155/2012/123843

Research Article Survey of Water Bugs in Bankim, a New Buruli Ulcer Endemic Area in Cameroon

Solange Meyin A. Ebong,[1,2,3] Sara Eyangoh,[1] Estelle Marion,[4,5,6,7] Jordi Landier,[8] Laurent Marsollier,[4,5,6] Jean-François Guégan[3,9], and Philippe Legall[10,11,12]

[1]Service de Mycobacteriologie, Centre Pasteur du Cameroun, Cameroun-R´eseau International des Institut Pasteur, BP 1274 Yaound´e, Cameroon
[2]Biodiversit´e et Evolution des Complexes Plantes-Insectes Ravageurs-Antagonistes UR-072,´ Institut de Recherche pour le D´eveloppement Cameroun, Yaound´e, Cameroon
[3]UMR MIVEGEC IRD, CNRS, Universit´es de Montpellier 1 et 2, Centre IRD de Montpellier, Montpellier, France
[4]Centre de Recherche sur le Cancer Nantes-Angers, LUNAM, Universit´e de Nantes and Universit´e d'Angers, 49000 Angers, France [5]UMR 892, Inserm, 49000 Angers, France
[6]UMR 6299, CNRS, 49000 Angers, France
[7]Groupe d'Etude des Interactions Hote-Pathogˆ`ene, Universit´e d'Angers, 49000 Angers, France
[8]Unit´e d'Epid´emiologie des Maladies Emergentes, Institut Pasteur, Paris, France
[9]Ecole des Hautes Etudes en Sant´e Publique, Centre Interdisciciplinaire BIODIV, EHESP, Montpellier, France
[10]Institut de Recherche pour le D´eveloppement (IRD), UR 072, BP1857, Yaound´e, Cameroon
[11]Laboratoire Evolution, G´enomes et Sp´eciation, UPR 9034, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 91198 Gif sur Yvette Cedex, France
[12]Universit´e Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France
Correspondence should be addressed to Sara Eyangoh, eyangoh@pasteur-yaounde.org
Received 15 July 2011; Revised 8 February 2012; Accepted 5 March 2012

Academic Editor: Nildimar Honorio´

Copyright © 2012 Solange Meyin A. Ebong et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Buruli ulcer is a debitliating human skin disease with an unknown transmission mode although epidemiological data link it with swampy areas. Data available suggest that aquatic insects play a role in the dissemination and/or transmission of this disease. However, their biodiversity and biology remain poorly documented. We conducted an entomological survey in Bankim, Cameroon, an area recently described as endemic for Buruli ulcer in order to identify the commonly occurring aquatic bugs and document their relative abundance, diversity, and spatial distribution. Collection of aquatic bugs was realized over a period of one month by daily direct capture in different aquatic environments (streams, ponds, and rivers) and through light traps at night. Globally, the data obtained showed the presence of five families (Belostomatidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae, and Gerridae), their abundance, distribution and diversity varying according to the type of aquatic environments and light attraction.

Introduction

Buruli ulcer is a debilitating human skin disease caused by *Mycobacterium ulcerans* [1, 2]. This infection is a neglected emerging disease that has recently been reported in some countries as the second most frequent mycobacterial disease in humans after tuberculosis [3, 4]. The majority of cases are localized in Africa occurring mainly in poor local communities. Other cases have been reported in Asia, Australia, and South America [1].

Despite the increasing number of endemic areas, the exact mode of transmission of *M. ulcerans* remains unclear.

Buruli ulcer has always been associated with swampy areas [5–10]. The role of aquatic insects in Buruli ulcer transmission has been suggested by some studies in the past 10 years [11, 12]. Experimental laboratory studies have confirmed this possibility by showing that *M. ulcerans* was able to settle in glands of water bugs and transmitted to mice through bitings. Field investigations found that water bugs captured in endemic areas were positive for M. ulcerans [13–19]. Recently, viable *M. ulcerans* was detected in saliva of water bugs [20]. These studies allowed proving that water bugs are the host and a probable vector of *M. ulcerans*. However, the exact role of aquatic bugs remains to be clarified. Indeed, the etiological agent of Buruli ulcer may be introduced by bites of these insects or by trauma at skin sites [11, 12, 21].

All over the world, about 45000 species of insects are known to inhabit diverse freshwater ecosystems [22, 23]. These insects are involved in nutrient recycling and form an important component of natural food webs in aquatic ecosystems [24]. They also serve as reliable indicators of ecological characteristics of water [25]. Among aquatic insects, water bugs belong basically to two categories: semiaquatic bugs which live upon the water surface and true water bugs which live beneath the water surface. Most of them are carnivorous and can even feed on small vertebrates such as fishes and amphibians [26–28]. The majority of water bug species are also known to display flying activity, in their adult forms at night when attracted to light [29–32]. They may therefore also play a role in *Mycobacterium ulcerans* dissemination in the environment as suggested by [20, 33–35].

Bankim district has been described recently as a Buruli ulcer endemic site in Cameroon, and aquatic bugs collected in this region were positive for *M. ulcerans* [34]. But aquatic bugs' biodiversity and biology are poorly documented, making it hard to characterize the relations between *M. ulcerans* and these aquatic insects. In the above-mentioned context, the present study was carried out with 2 objectives:

(1) to identify the commonly occurring medium and large size aquatic bugs fauna elements; to work out their relative abundance, diversity; to perform comparison between daytime square-net captures and night time light trap captures;

(2) to provide a database and spatial distribution of aquatic bugs related with Buruli ulcer cases in this area.

Materials and Methods

2.1. Sites of Study. Capture of aquatic bugs was organized within June 2009 in Bankim (6.0405N 10.2737E), a rugged land in north-western Cameroon at an altitude of about 750 meters. This region represents a transition between forested south and savanna north. Its geography, tropical climate and population contexts differ from the forested Nyong River Basin, the endemic region of Central Cameroon. The building of a dam on the Mape River in 1989 profoundly modified the environment by creating an artificial lake of 3.2 billion m^3 capacity. This study was carried out in selected water bodies (5 streams, 3 ponds, 1 river) and in different geographic landscapes like the savanna around the dam, near the habitations, and the forest around the Mbam River. Water bodies were located around Bankim town, in Ngom and along the Bankim Mappe road (´ Figure 1(a)). The incidence of Buruli ulcer in this region is increasing [34]. Farming is the main activity with specific population groups raising cattle and other involved in commercial fishing. The population density is about 30 inhabitants/km^2. The prevalence of Buruli ulcers in this endemic area is represented in Figure 1(b).

2.2. Aquatic Bug Capture and Sampling. The medium and large size water bugs were collected using two sampling methods: direct method in aquatic environment and indirect method by using light trap to capture winged imagos.

Direct collection of insects was performed daily for a period of one month in water bodies. Sampling was made by hauling a square-net (32 × 32cm and 1mm in mesh size) from the surface to a depth of 1 meter and over a distance of 1 meter. A given sample corresponds to the mixture of all insects collected after 45 minutes. After collection, insects were transported in labelled plastic bottles containing freshwater from the site. Adults as well as nymphs were then selected, counted, and preserved in 70% ethanol for laboratory identification. For each site, GPS coordinates, nature, and intensity of human activities in water, type of water body were noted.

Night time light trapping was used for indirect insect collection. This mobile light trap consisted of a 250W bulb connected to an electrical generator put in front of a white sheet. Light traps were installed, respectively, five times around the dam and the Mbam River and 4 times near habitations from 6:30PM to 11:00PM beginning at full moon and ending at the end of lunar cycle. All attracted insects were collected in labelled plastic bottles containing 70° ethanol and processed as indicated previously [20].

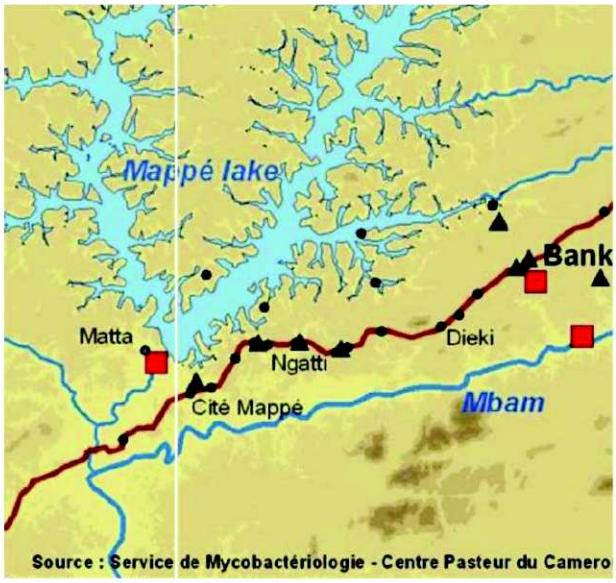
Three sites were selected for night time collection, one by the forest zone Matta, another in the savannah Bankim, and the last one near habitation.

2.3. Water Bugs Identification. Aquatic Heteroptera, generally called water bugs, forms three infraorders of Hemiptera order (Leptopodomorpha, Geromorpha, and Nepomorpha) which belong to the Insect class and the Arthropoda phylum. Heteroptera is mainly identified by observing:

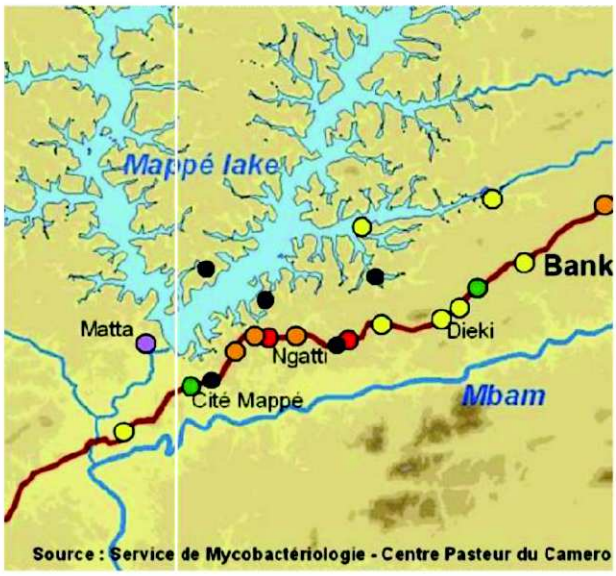
(1) piercing-sucking mouthparts, with a segmented rostrum arising from the front of the head;

(2) two pairs of wings in adults: partly membranous forewings; hemelytra and fully membranous hind wings.

Identification of water bugs took place in the entomological laboratory of the Institute of Agricultural Research for Development (IRAD) in Yaounde Cameroun. Each collected´ specimen was attributed to a given family on the basis of the Heteroptera family determination criteria [36]. Currently, identification keys enable identification only for water bug families.



(a)



(b)

Figure 1: (a) Study site; (b) Buruli ulcer case prevalence per village.

Results

3.1. Direct Insect Collection. Globally, 728 water bugs were collected, within which 338 were collected directly in aquatic environments and 390 captured through light traps. Those collected in aquatic environment belong to five families (Belostomatidae 33.13% (N = 112), Naucoridae 27.81% (N= 94), Nepidae 28.09% (N= 95), Notonectidae 5.91% (N = 20), and Gerridae 5.02% (N = 17)). But their abundance, distribution, and diversity vary according to the type of water body. The river was poor in aquatic bug population, with only one family captured; Nepidae (N= 9) represented by two subfamilies Ranatrinae (N = 3) and Nepinae (N= 6). Generally, in the ponds and streams, the five families were present but their abundance and diversity seem only dependent on the geographical location of the collecting site as on Figure 2(a).

3.2. Indirect Insect Collection. Light trap indirect collection yielded 390 specimens belonging only to 2 families; Belostomatidae represented 80.51% and Notonectidae 19.48% (Figure 2(b)). During the full moon, only the Notonectidae family come to light; Belostomatidae were absent at this phase of the, but they appeared a few nights after (Figure 2(b)). Belostomatidae family was very abundant mainly during the few nights that precede or follow the full moon, showing several peaks, which decreased progressively for rescinding at a few nights before full moon. Whatever the site of collection, the numerical variations of water bugs captured by light trap were almost consistent with Belostomatidae being prominent, that is, 33.33% of Belostomatidae and 5.12% of Notonectidae in the forest; 25.64% of Belostomatidae and 11.94% of Notonectidae in the savanna; 21.53% of Belostomatidae and 2.56% of Notonectidae near habitations (Figure 3(a)).

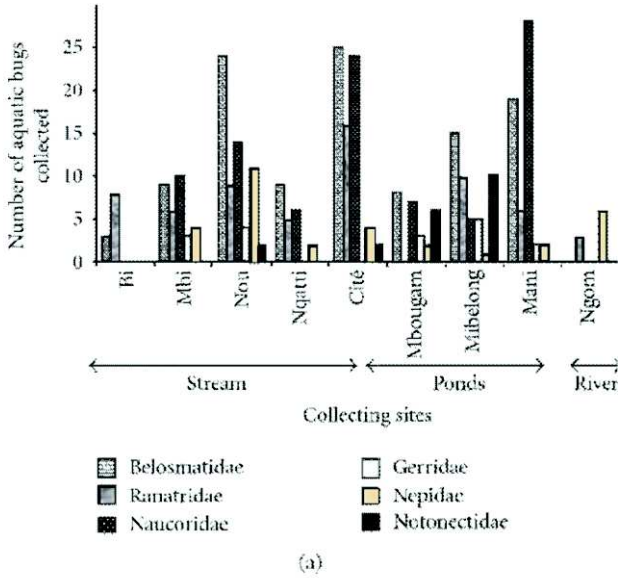


Figure : Aquatic bugs caught in a light traps per families according to lunar phases.

Table 1: Identification of water bugs collected directly in aquatic environment and indirectly by light trap.

Category	Family	Sub family	Genus	Direct collection	Indirect collection
True water bugs	Belostomatidae	Belostomatinae	Appasus	112	114
	Belostomatidae	Lethocerinae	Lethocerus	0	200
	Nepidae	Rantrinae	ND	63	0
	Nepidae	Nepinae	ND	32	0
	Naucoridae		ND	94	0
	Notonectidae	Anisopinae	ND	14	46
	Notonectidae	Notonectinae	ND	6	30
Semiaquatic bugs	Gerridae	Gerrinae	ND	17	0

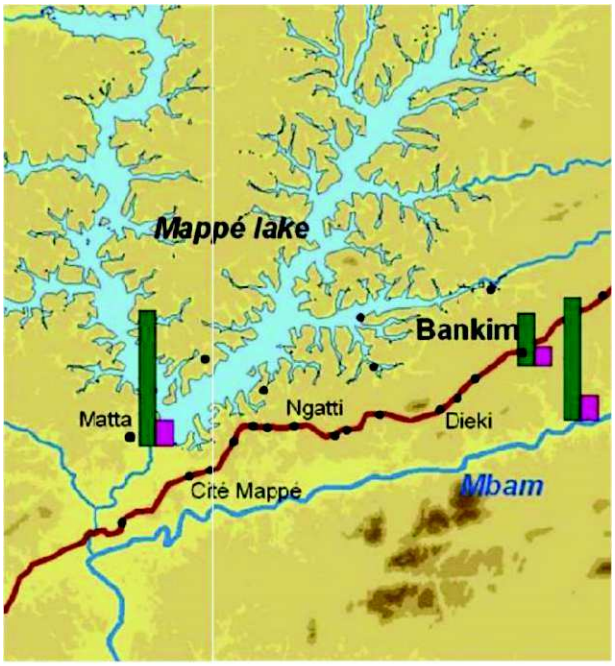
Discussion

4.1. Abundance Variation according to Type of Water Bodies. We noted that streams and ponds which were slow and stagnant showed the highest number of water bugs: 59.17% in the streams and 38.16% in the ponds. The number of individuals was quasinil in the river; only 9 (2.66%) water bugs were collected in the river perhaps because of its rapid flow. Furthermore, aquatic vegetation was abundant in streams and ponds, but it was scarce in the river. In all water bodies selected, we observed human activities but we cannot say if they influenced or not diversity of aquatic bugs. Nevertheless, it seems that diversity of water bugs was related with nature of water currents and presence of aquatic vegetation.

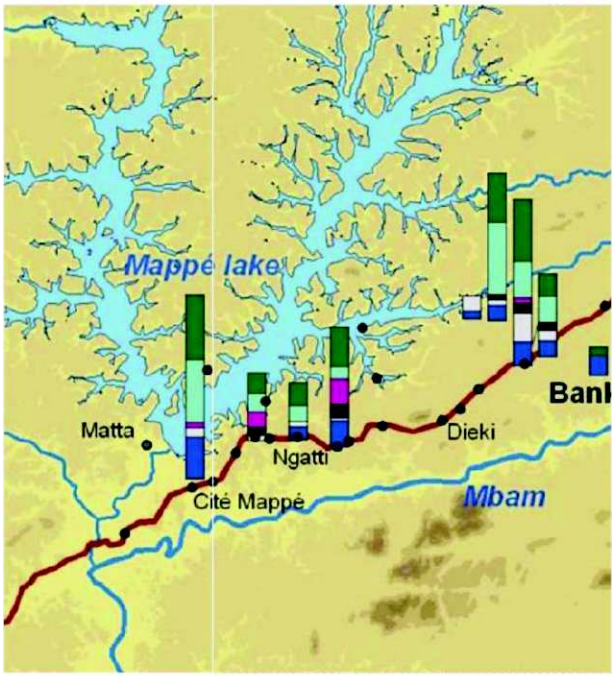
Spatial distribution of aquatic bugs is not uniform and does not depend on the type of water body but on the geographical location as illustrated in Figures 2(a) and 3(b). For example, Notonectidae family was met in only 2 of the five streams and 2 of the 3 ponds. Belostomatidae and Naucoridae were found in all ponds and streams. These last two families (Belostomatidae and Naucoridae) are carnivorous and suspected to play a role in the transmission of Buruli ulcer and in the ecological expansion of the *Mycobacterium ulcerans* niche.

4.2. Abundance Variation according to Moon Cycle. During the moon cycle, Notonectidae family was present at all times but in less important numbers. These results agreed with the results obtained concerning flight activity of Belostomatidae [26]. Light trapping proved to be an interesting method to obtain important numbers of Belostomatidae and Notonectidae but reflected poorly the overall diversity of water bugs.

The number of water bugs is more important around the Mbam River which was situated in the forest than the other sites installed light trap. The installation near the habitations showed the least number of aquatic bugs.



(a)



(b)

Figure 3: (a) Distribution of Hemiptera captured in the night by light traps; (b) distribution of Hemiptera collected directly in the water bodies by square-net.

These results concerning the abundance of water bugs in the area neighbouring the Mbam River are to be related with the results of an epidemiological survey performed simultaneously [10]. In this case-control study,

having baths for hygiene in the Mbam River was shown to increase the risk of Buruli ulcer in the populations odds ratio (95% confidence interval) = 6.9 (1.4–35).

4.3. Seasonal Variations. Water bugs collection conducted in Bankim during the rainy season in June permitted us to identify five water bug families: four families of true water bugs and one semiaquatic bugs (Table 1). These families include many unknown species as determination keys for water bugs species are not yet available for West Africa. These results are low comparing with those in another study in the same region during the long dry season in January which showed 1349 specimens belonging eight families [34]. In this study, Mycobacterium ulcerans molecular signatures were searched; among 244 insect pools (pool = group of ten insects belong the same family), 12 (5%) were M. Ulcerans positive. M. ulcerans-positive saliva was found in 11 (18%) of 61 insects in the family Belostomatidae and in 3 (8%) of 38 in the family Naucoridae. Beyond number of families in two studies, a large difference in numerical data of insect specimens was observed, 728 during the rainy season against 1349 in the long dry season. More sampling is required to confirm these results. All water bugs families collected in this study (Figure 4) were found in Akonolinga, the other Buruli ulcer endemic area in Cameroon [20].

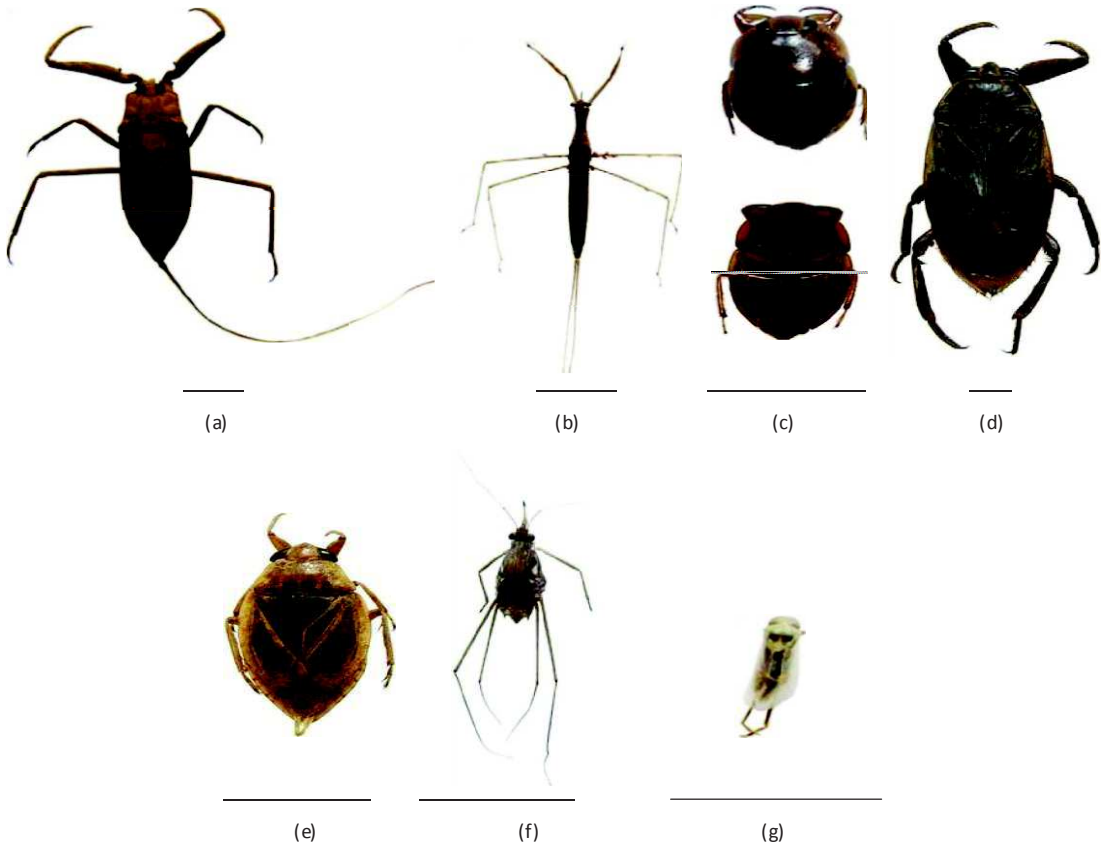


Figure 4: Specimens of water bugs collected during the study. (a) Nepinae, (b) Ranatrinae, the two subfamilies of Nepidae, (c) Naucoridae family (dorsal and ventral views), two morphotypes Belostomatidae, (d) giant Belostomatidae, (e) small size Belostomatidae, (f) Gerridae, and (g) Notonectidae

Conclusion

This preliminary entomological survey in Bankim shows the distribution and diversity of aquatic bugs colonization of water bodies and reveals that their flight activity is influenced by light (direct and moon light). It also shows that the diversity of water bugs depends partly on the types of water bodies in the same endemic area, with streams and ponds seeming to be selective habitats offering best life conditions. Light attraction and the moon phases appeared to be influencing factor for aquatic bug's distribution. In prospective, this preliminary results need to be confirmed through monthly collection in endemic and nonendemic areas. Moreover, detection of *M. ulcerans* in salivary glands of the water bugs, in particular those are able to bite humans (Belostomatidae and Naucoridae), will support their involvement in ecology and transmission of M. ulcerans [20].

Acknowledgments

The authors would like to thank all persons who helped in the realization of this study particularly communities in Bankim, staff of the entomological laboratory of the Institute of Agricultural Research for Development (IRAD) in Yaounde, Cameroun, for helping in identifying water bugs.´ Thanks also to the field team Valentin Angoni and Daniel Gnavo for helping in collection of water bugs. Thanks to Afi Leslie for the help in translation and proofreading. This work was supported by Reseau International des Instituts Pasteurs´ (PTR 212, Inter-Pasteurien Concerted Actions A15/2008), Institut de Recherche pour le Developpement (IRD) projet´ (Jeune Equipe Associee´ a l'IRD (JEAI)-ATOMyc), Fondation` Franc¸aise Raoul Follereau, Region Pays de la Loire, Institut´ National de Sante et de la Recherche M´ edicale (Inserm), and´ the French Agence Nationale de la Recherche (programme CEP&S). S. Meyin is a student in JEAI team.

References

[1] K. Asiedu, R. Sherpbier, and M. C. Raviglione, "Buruli Ulcer Mycobacterium ulcerans infection," W.H.O. Global Buruli Ulcer Initiative 2000, World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 2000.

[2] M. T. Silva, F. Portaels, and J. Pedrosa, "Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite Mycobacterium ulcerans leading to Buruli ulcer," The Lancet Infectious Diseases, vol. 9, no. 11, pp. 699–710, 2009.

[3] G. Amofah, F. Bonsu, C. Tetteh et al., "Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search," Emerging Infectious Diseases, vol. 8, no. 2, pp. 167–170, 2002.

[4] G. E. Sopoh, R. C. Johnson, A. Chauty et al., "Buruli ulcer surveillance, Benin, 2003–2005," Emerging Infectious Diseases, vol. 13, no. 9, pp. 1374–1376, 2007.

[5] Uganda Buruli Group, "Epidemiology of Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda," Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 65, no. 6, pp. 763–775, 1971.

[6] B. J. Marston, M. O. Diallo, C. R. Horsburgh Jr. et al., "Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire," American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 52, no. 3, pp. 219–224, 1995.

[7] B. Roberts and R. Hirst, "Immunomagnetic separation and PCR for detection of Mycobacterium ulcerans," Journal of Clinical Microbiology, vol. 35, no. 10, pp. 2709–2711, 1997.

[8] B. C. Ross, P. D. Johnson, F. Oppedisano et al., "Detection of Mycobacterium ulcerans in environmental samples during an out break of ulcerative disease," Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 10, pp. 4135–4138, 1997.

[9] Uganda Buruli Group, "BCG vaccination against Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer). First results of a trial in Uganda," The Lancet, vol. 1, no. 7586, pp. 111–115, 1969.

[10] J. Landier, P. Boisier, F. Fotso Piam 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 Neglected Tropical Diseases, vol. 5, no. 11, Article ID e1392, 2011.

[11] F. Portaels, K. Chemlal, P. Elsen et al., "Mycobacterium ulcerans in wild animals," OIE Revue Scientifique et Technique, vol. 20, no. 1, pp. 252–264, 2001.

[12] F. Portaels, P. Elsen, A. Guimaraes-Peres, P. A. Fonteyne, and W. M. Meyers, "Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection," The Lancet, vol. 353, no. 9157, p. 986, 1999. [13] S. Adusumilli, A. Mve-Obiang, T. Sparer, W. Meyers, J. Hayman, and P. L. Small, "Mycobacterium ulcerans toxic macrolide, mycolactone modulates the host immune response and cellular location of M. ulceransin vitro and in vivo," Cellular Microbiology, vol. 7, no. 9, pp. 1295– 1304, 2005.

[14] L. Marsollier, J. P. Andre, W. Frigui et al., "Early tra´ fficking events of Mycobacterium ulcerans within Naucoris cimicoides," Cellular Microbiology, vol. 9, no. 2, pp. 347–355, 2007.

[15] L. Marsollier, J. Aubry, E. Coutanceau et al., "Colonization of the salivary glands of Naucoris cimicoides by Mycobacterium ulcerans requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone," Cellular Microbiology, vol. 7, no. 7, pp. 935–943, 2005.

[16] L. Marsollier, P. Brodin, M. Jackson et al., "Impact of Mycobacterium ulcerans biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis," Plos Pathogens, vol. 3, no. 5, article e62, 2007.

[17] L. Marsollier, E. Deniaux, P. Brodin et al., "Protection against Mycobacterium ulcerans lesion development by exposure to aquatic insect saliva," Plos Medicine, vol. 4, no. 2, article e64, 2007.

[18] L. Marsollier, R. Robert, J. Aubry et al., "Aquatic insects as a vector for Mycobacterium ulcerans," Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, no. 9, pp. 4623–4628, 2002.

[19] J. R. Wallace, M. C. Gordon, L. Hartsell et al., "Interaction of Mycobacterium ulcerans with mosquito species: implications for transmission and trophic relationships," Applied and Environmental Microbiology, vol. 76, no. 18, pp. 6215–6222, 2010.

[20] E. Marion, S. Eyangoh, E. Yeramian et al., "Seasonal and regional dynamics of M. ulcerans transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors," Plos Neglected Tropical Diseases, vol. 4, no. 7, article e731, 2010.

[21] W. M. Meyers, W. M. Shelly, D. H. Connor, and E. K. Meyers, "Human Mycobacterium ulcerans infections developing at sites of trauma to skin," American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 23, no. 5, pp. 919–923, 1974.

[22] J. Reese and J. Voshell, A Guide to Common Freshwater Invertebrates of North America Blacksburg, McDonald and Woodward Publishing Company, 2002.

[23] J. Heino, "Biodiversity of aquatic insects: spatial gradients and environmental correlates of assemblage-level measures at large scales," Freshwater Reviews, vol. 2, no. 1, pp. 1–29, 2009.

[24] G. E. Belovsky and J. B. Slade, "Insect herbivory accelerates nutrient cycling and increases plant production," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, no. 26, pp. 14412–14417, 2000.

[25] V. H. Resh, "Multinational, fresh water biomonitoring programs in the developing world: lessons learned from African and Southeast Asian river surveys," Environmental Management, vol. 39, no. 5, pp. 737–748, 2007.

[26] N. M. Andersen and T. A. Weir, Eds., Australian Water Bugs. Their Biology and Identification, Apollo Books, 2004.

[27] M. J. Cullen, "The biology of giant water bugs (Hemiptera: Belostomatidae) in Trinidad," Proceedings of the Royal Entomological Society of London A, vol. 44, no. 7–9, pp. 123–136, 1969.

[28] K. Kopp, M. Wachlevski, and P. C. Eterovick, "Environmental complexity reduces tadpole predation by water bugs," Canadian Journal of Zoology, vol. 84, no. 1, pp. 136–140, 2006.

[29] J. Bowden, "The relation of activity of two species of Belostomatidae to rainfall and monlight in Ghana," Journal of Entomology Society of South of Africa, vol. 26, pp. 293–301, 1964.

[30] D. A. Lytle, "Use of rainfall cues by Abedus herberti (Hemiptera: Belostomatidae): a mechanism for avoiding flash floods," Journal of Insect Behavior, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 1999.

[31] Y. Mukai and M. Ishii, “Habitat utilization by the giant water bug, Appasus (=Diplonychus) major (Hemiptera: Belostomatidae), in a traditional rice paddy water system in northern Osaka, central Japan,” Applied Entomology and Zoology, vol. 42, no. 4, pp. 595–605, 2007.
[32] I. A. D. Robertson, Records of Insects Taken at Light trapos in Tanzania. Distribution and Seasonal Change in Catches of Belostomatidae (Hemiptera: Heteroptera) Innrelation to Rainfall, Center for Overseas Pest Research, London, UK, 1976.
[33] E. Marion, C. Deshayes, A. Chauty et al., “Detection of Mycobacterium ulcerans DNA in water bugs collected outside the aquatic environment in Benin,” M´edecine Tropicale, vol. 71, no. 2, pp. 169–172, 2011.
[34] E. Marion, J. Landier, P. Boisier et al., “Geographic expansion of buruli ulcer disease, cameroon,” Emerging Infectious Diseases, vol. 17, no. 3, pp. 551–553, 2011.
[35] F. Portaels, W. M. Meyers, A. Ablordey et al., “First cultivation and characterization of Mycobacterium ulcerans from the environment,” Plos Neglected Tropical Diseases, vol. 2, no. 3, article e178, 2008.
[36] M. Dethier, “Introduction a la morphologie, la biologie et la` classification des Het´ erotp´ eres,”` Bulletin Romand d’Entomologie, vol. 1, pp. 11–16, 1981.

CHAPITRE 2

Approche intégrative (morphologique et moléculaire) de la délimitation des espèces de punaises aquatiques du Cameroun

A la suite du premier chapitre, le deuxième chapitre est consacré à la détermination des espèces de punaises aquatiques rencontrées au Cameroun en utilisant une approche moléculaire. Encore appelée “barcode moléculaire”, cette approche comble les manquements de la taxonomie morphologique. Le “barcode moléculaire”, développé par le «Universal Product Code» au début des années 1970 en s’inspirant du « Classifying Apparatus and Method » et standardisé en 2003 [92], consiste en l’utilisation d’une portion de séquences d’ADN pour identifier les individus au niveau spécifique comme le ferait un code barre pour identifier un produit commercialisé.

En effet, chez tous les organismes vivants, il existe un fragment d’ADN appelé barcode standard. Chez les animaux, cette région est située sur la portion de gène mitochondrial codant pour la première sous-unité du cytochrome oxydase I (COI) de 658 paires de bases, une protéine qui intervient dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie [92-94]. Outre la présence de ce gène chez tous les organismes vivants, plusieurs autres raisons qui justifient son choix comme “barcode moléculaire” universel [92] sont les suivantes :

1. le gène choisi est codant et donc pas d’introns. De plus, il y a peu de délétions et d’insertions. De ce fait, les problèmes d’alignements des séquences et les analogies sont limités ;

2. il existe plusieurs copies par cellule, ce qui facilite l’amplification ;

3. il est communément admis que le couplage d’un mode de transmission maternel et d’un état haploïde fait que le tri complet du polymorphisme ancestral sera plus rapidement atteint avec des gènes mitochondriaux qu’avec des gènes nucléaires, et permettra ainsi de visualiser plus rapidement des espèces par ces gènes [95]. Le taux de mutation le plus élevé de l’ADN mitochondrial comparativement à l’ADN nucléaire constitue un avantage à son utilisation comme marqueur moléculaire pour différencier des entités spécifiques [96];

4. enfin, la transmission maternelle garantit l’absence de recombinaisons entre les chromosomes maternels et paternels, ce qui permet de retracer plus aisément l’histoire évolutive d’une lignée sans les «interférences» des recombinaisons.

Ce choix a été confirmé par plusieurs travaux qui ont établi que COI fournit une forte séparation au niveau des espèces pour plusieurs groupes d'animaux par exemple les oiseaux [97], les fourmis [98], les lépidoptères où ils distinguent 13 nouvelles espèces [99].

L’approche moléculaire développée dans ce chapitre s’est limitée à la délimitation des espèces putatives de punaises aquatiques rencontrées au Cameroun en utilisant une méthode basée sur les distances génétiques qui consiste à regrouper les séquences en MOTUs (Molecular Operational Units) telle que «Automatic Barcoding Gap Discovery » (ABGD) [100]. Ces approches morphologique et moléculaire sont actuellement utilisées dans la taxonomie intégrative des organismes vivants [101].

Article 2 : Molecular species delimitation and morphology for the determination of aquatic and subaquatic bugs (Heteroptera) potentially implicated in the Buruli ulcer in Cameroon

Solange Meyin A Ebong[1,2,6,*,†], Elsa Petit[3,7*], Philippe Le Gall[1,3], Ping Ping Chen[8,] Nico Nieser[8], Eric Guilbert[9], Flobert Njiokou[6], Laurent Marsollier[5], Jean-François Guegan[4], Dominique Pluot-Sigwalt[9], Sara Eyangoh[2], Myriam Harry[3,7]

Article accepté à PLoS One Journal avec Major Revision

Molecular species delimitation and morphology for the determination of aquatic and subaquatic bugs (Heteroptera) potentially implicated in the Buruli ulcer in Cameroon

Solange Meyin A Ebong[1,2,6,*,†], Elsa Petit[3,7*], Philippe Le Gall[1,3], Ping Ping Chen[8,] Nico Nieser[8], Eric Guilbert[9], Flobert Njiokou[6], Laurent Marsollier[5], Jean-François Guegan[4], Dominique Pluot-Sigwalt[9], Sara Eyangoh[2], Myriam Harry[3,7]

[1] IRD, BP 1857 Yaoundé, Cameroon
[2] Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274 Yaoundé, Cameroon
[3] EGCE (Évolution, Génomes, Comportement, Écologie) UMR 247 IRD, CNRS, Univ. Paris-Sud, IDEEV, Univ. Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex, France
[4] UMR MIVEGEC IRD, CNRS, Universités de Montpellier 1 et 2, Centre IRD de Montpellier, France
[5] Inserm Avenir ATOMycA CRCNA Inserm U892 & CNRS U6299, Université et CHU d'Angers, France
[6] Université de Yaoundé I, Laboratoire de Parasitologie et Ecologie, Faculté des Sciences, Yaoundé, Cameroon
[7] Université Paris Sud 11, Orsay, France
[8] National Museum of Natural History, Naturalis, Leiden, The Netherlands
[9] Museum National d'Histoire Naturelle, Département Systématique et Evolution, UMR7205 CNRS/MNHN, Paris, France

[*] These authors participated equally to this manuscript
[†]Corresponding authors

Abstract

Aquatic and semi-aquatic bugs (Heteroptera) represent a remarkable diversity and a resurging interest has been given to documenting the species of these insects inhabiting Cameroon in Central Africa due to their potential implication in the transmission of the bacterium Mycobacterium ulcerans, the causal agent of Buruli ulcer, an emerging human disease. A survey was carried out over two years in Cameroon. Morphological analyses were done in two steps. A first step consisted in separating the specimens based on broadly shared characters into morphotypes. The specimens were then separated into two independent batches containing each the same representation of each morphotype. One batch (309 specimens) was used by taxonomists experts on aquatic bugs for species-level identification and/or to reconcile nymph with their corresponding adult species. The second batch (188 specimens) was used to define species based on the COI DNA sequences (standard sequence used for "DNA barcoding") and using the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD). The first morphological analysis step separated the specimens into 63 different morphotypes (49 adults and 14 nymphs), which were then found to belong to 54 morphological species in the infra-orders Gerromorpha and Nepomorpha based on the species-level morphological identification, and 41-45 putative molecular species according to the gap value retained based on the ABGD. Integrating morphology and "DNA barcoding" reconciled all the specimens into 62 aquatic bug species in Cameroon. Generally, we obtained a good congruence between species a priori identified based on morphology from adult morphotypes and molecular putative species. Moreover, molecular identification has allowed associating 86% of nymphs with adults. This work illustrates the importance of integrative taxonomy.

Keywords: Aquatic bugs, Cameroon, Central Africa, Biodiversity, DNA barcoding, Gerromorpha, Nepomorpha, Species diversity

Introduction

Aquatic and sub-aquatic true bugs (Heteroptera), comprised in the Leptopodomorpha, Gerromorpha and Nepomorpha infraorders, represent a remarkable species diversity of the aquatic biota with 4,656 species from 326 genera and 20 families found worldwide except in Antarctica [1]. Several surveys of aquatic bugs were carried out in the 1940s in Africa, specifically in West and Central Africa i.e. the Ivory Coast [2], and Cameroon [3-5]. After this period, the aquatic bugs of West Africa were not studied for decades. But since the 2000s, a resurging interest has grown documenting the species of aquatic and sub-aquatic bugs inhabiting Cameroon because some are suspected to be implicated in the transmission of Mycobacterium ulcerans, the causal agent of an emerging human disease named Buruli ulcer [6-11].

The current taxonomy of bugs is mostly based on morphological characters of adults which are more or less reliable because of their intraspecific variability. Moreover, immature forms are difficult to identify based only on morphology because of lack of discriminating characters [12]. Therefore, complementary approaches must be developed to address taxonomic issue in Heteroptera. Thus, [13] have shown a good congruence between morphological and 18S molecular data to delineate infraorders of Heteroptera but at the species level, more variable sequences than 18S are required. In order to identify taxa which are difficult to separate only based on their morphology, different authors have proposed the “DNA barcoding” by using a standard region of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase subunit I (COI) [14-16]. Several studies have now established that the COI gene is very useful in insect taxonomy including Hemiptera, especially aphids e. g. [17-19], but also true bugs [17].

Initial works [20, 21] reported some limitations using COI-based identification for some Heteropteran groups, but in recent studies, true bug taxa have been identified at both family and species levels, from Asia [17], Korea [22] or Brazil [23].

With the growing implementation of DNA barcoding, it is now possible not only to assign a sample to a pre-existing classification but also to identify unknown species and to decide whether species should be separated or merged using various delimitation methods. Two main classes of methods exist: distance-based methods which consist in clustering sequences in MOTUs (Molecular Operational Units) like the Automatic Barcoding Gap Discovery method (ABGD) [24] and phylogeny-based like the Generalized Mixed Yule Coalescent method (GMYC) [25] or the Poisson Tree Processes (PTP) [26].

Here, we integrate both methods based on morphology and molecular Data. The ABGD method with COI sequences was applied for the molecular species delimitation. This study aims to contribute to better understand the Cameroon’s biodiversity of aquatic and sub-aquatic bugsputatively involved in the transmission to humans of the environmentally-persistent bacteria Mycobacterium ulcerans.

Materials and Methods

Sampling of water bugs across Cameroon, Africa

Sampling insects were collected in 10 locations in Cameroon including two existing endemic zones for Buruli ulcer (Akonolinga and Bankim) and eight non-endemic zones with the same ecological characteristics that the two endemic ones (Mbalmayo, Abong-Mbang, Garoua, Tibati, Ngaoundéré, Bamenda, Buéa and Santchou) (Fig. 1). Aquatic and sub-aquatic bugswere collected using two sampling methods: directly in aquatic environment hauling a metallic dip net (32 × 32 cm and 1 mm in mesh size) within a surface of 1 m^2 and at different depth levels (down to a depth of 1 m), and indirectly by using light trapping to capture winged imagoes. Aquatic sampling including a large variety of streams, rivers, swamps and flooded areas was performed in triplicate each survey session, on three consecutive mornings. Light traps were installed twice each survey session in each site from 6:30PM to 11:00PM. Two survey periods were realized in 2011 (March to June) and 2012-2013 (September 2012 to February 2013) in the endemic (4 times and 6 times respectively for each survey period) and non-endemic zones (2 times at each survey period). After collection, adults and nymphs (L5) were selected, counted, and preserved in 70% ethanol for morphological identification and molecular analyses. The 22,375 specimens collected were first classified by family using the Heteroptera classification given by [27] and then identified as morphotypes in each family. For each morphotype, two independent batches were used, one (n= 309) for advanced morphological identification at the “Museum National d’Histoire Naturelle” (MNHN) at Paris in France and National Museum of Natural History (NMNH) in Leiden in The Netherlands, the other (n = 188) for the molecular identification in the EGCE laboratory at Paris.

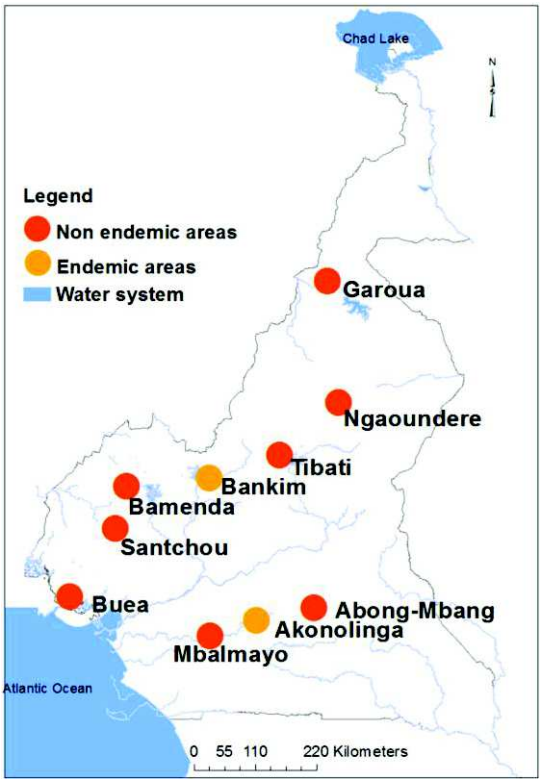


Fig.1 Buruli ulcer endemic and non-endemic samples sites of aquatic bugs in Cameroon.
Red colored points correspond to non-endemic Buruli ulcer zones, yellow colored points correspond to endemic Buruli ulcer zones.

Morphological identification

The 309 specimens were identified down to the species or genus using the pioneer taxonomic work of Poisson on Afrotropical aquatic Heteroptera [2-5,28-33], and other more recent major works [34-36]. When necessary, several collections (MNHN Paris, NMNH Leiden) were also consulted to compare specimens.

COI amplification

A total of 188 specimens were analyzed among which 45 nymphs and 143 adults. About four individuals per morphotype were sampled for DNA sequence analysis. Total DNA was extracted from legs or full body for small insects, using the NucleoSpin Tissue XS [37] according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were done in 20 µl reaction volumes containing 10 µM of each dNTP (Promega), 10 µM of each primer, 0.5 U of Taq DNA Polymerase (Promega), 1× PCR Buffer (Promega), and DNA extract at about 1/µl. The gene fragments (COI) was amplified using the following pairs of the specific primers LCO 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'and
HCO 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' [38].

PCR always started with a denaturation step of 94°C for five min, followed by 25 cycles comprising denaturation at 94°C, for 1 min, annealing at 50°C for 1.5 min and elongation at 72°C for 1 min, and ended with a ten minutes final elongation at 72°C PCR products were cleaned by

Exosap IT [39], a single-step enzymatic clean up that eliminates unincorporated primers and dNTPs. The cleaned products were sequenced for COI molecular data set.

Alignments and phylogenetic analyses

The cleaned products were then sequenced to 690 bp nucleotides. Multiple alignments were made using ClustalW according to the default settings: full multiple alignments with bootstrap number equal to 1000. Finally, we obtained 171 COI homologous sequences data set of 669bp. We corroborated the (99%) homology of our sequences with COI sequences obtained from BLAST-GenBank and added to our data set some Genbank reference sequences of COI (see Table 1 for accession numbers).

We ran a Maximum Likelihood analysis within MEGA version 5 [40] adding the outgroup Graphocephala cythura (Table 1). We ran the command "best DNA models" in MEGA, which computes the maximum likelihood fits and selects the best model for 24 different nucleotide substitution models. The best score was obtained for GTR+G+I. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates (Felsenstein, 1985) was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically as follows. When the number of common sites was < 100 or less than one fourth of the total number of sites, the maximum parsimony method was used; otherwise BIONJ method with MCL distance matrix was used. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.6035)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 42.9957% sites). The trees were drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair.

Table 1. Accession numbers of sequences used for comparison.

Species name	gi number	gb number
Gerris incognitus	835444006	KR037174.1
Gerris pingreensis	835445531	KR037510.1
Gerris insperatus	835441952	KR036735.1
Limnoporus notabilis	835436700	KR035582.1
Hydrometra stagnorum	685164543	KM022870.1
Hydrometra martini	835440404	KR036402.1
Mesovelia furcata	685164925	KM023061.1
Rhagovelia obesa	835427944	KR033790.1
Rhagovelia tenuipes	381138988	JN689491.1
Aquarius remigoides	306993637	HQ105440.1
Rhagovelia obesa	835427944	KR033790.1
Microvelia douglasi douglasi	657639345	KJ819098.1
Graphocephala_cythura	227937233	FJ890836.1

Molecular-based species delimitation

Molecular putative species limits were explored with the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) [24]. This method uses the distribution of pairwise genetic distances to separate samples into putative species. The distribution of pairwise distances is bimodal with intra-specific variation and inter-specific variation separated by the barcode gap that is used as a threshold to delimit species. Alignments were uploaded at http://www.abi.snv.jussieu.fr /public/abgd/abgd.html and ABGD was run with the default settings (Pmin=0.001, Pmax= 0.1, Steps=10, X (relative gap width) =1, Nb bins=20) and with K2P distances.

Results

Morphological identification

Based on morphology, the 309 specimens of aquatic and sub-aquatic bugs studied were firstly grouped into 49 adult morphotypes. After the advanced morphological analysis comparing specimens to the aquatic and sub-aquatic bugscollections preserved in the Museums (MNHN, France; NMNH, The Netherlands), these morphotypes were dispatched in 54 species belonging to 11 different families (Tables 2 and 3). Indeed, ten morphotypes included two distinct species(Mor13, Mor16, Mor17, Mor18, Mor21, Mor25, Mor31, Mor33, Mor38 and Mor39), and in five cases, two morphotypes were merged in only one species, Mor23-25 identified as Anisops sardeus, Mor26-27 as Enithares glauca, Mor44-48 as Rhagovelia sp. 1, 40-41 as Mesovelia sp., Mor45-46 as Rhagovelia sp. 2, and Mor30-49 as Hebrus sp.However, for 14 specimens, no species name could be assessed.

In addition, MorL14 initially designated as a nymphal morphotype was identified as an adult of Neonychia congoensis congoensis Hungerford, 1946. For all remaining nymphal morphotypes it was impossible to attribute a specific name based on the morphology.

Molecular-based species delimitation

Using the ABGD method, we explored the limits between the different species using the COI sequence from 188 specimens including 49 adult and 14 nymphal morphotypes. The COI amplification failed for some adult morphotypes (Mor8, Mor18, Mor25, Mor33), certainly due to poor storage conditions. The molecular data set obtained for the 45 adult morphotypes were partitioned into 41-45 putative molecular species according to the gap value retained corresponding to distance values of 3.59% and 0.28%, respectively, whatever the genetic distance used (Table 4, S1Fig. and S2Fig.). Three morphotypes (Mor 28, 36, 42) were split into two species and it is also the case of two additional morphotypes Mor7 and Mor38 if the partition 3 is considered. In five cases two or three morphotypes were merged into one species (Mor26- 27, Mor31-32; Mor40-41-42, Mor44-48, Mor45-46, Mor49-30).

The Table 4 shows adult molecular species and the a posteriori associated species based on morphology.

Table 2. Relationships between adult morphotypes and species defined by morphological analysis in the Nepomorpha infraorder.

Families	MorAd	Loc	N/ sex	Species names defined by morphological analysis
Belostomatidae	[a]Mor1[b]	AM, A	5♀, 2♂	Appasus grassei grassei (Poisson, 1937)
	Mor2	A, T	2♀, 2♂	Appasus nepoides (Fabricius, 1803)
	Mor3	AM, B	4♀, 2♂	Appasus procerus procerus (Gerstaecker, 1873)
	Mor4	AM, B	2♀, 3♂	Appasus ampliatus Bergroth, 1890
	Mor5	G, M	2♂	Limnogeton fieberi Mayr, 1953
	Mor6	N	1♀, 1♂	Hydrocyrius nanus Montandon, 1907
	Mor7	G, A	1♀, 3♂	Hydrocyrius colombiae colombiae Spinola, 1852
	Mor8	AM, G	1♀, 4♂	Lethocerus cordofanus Mayr, 1953
Corixidae	Mor9	B	6♀, 5♂	Sigara (Tropocorixa) camerounensis Poisson, 1941
Micronectidae	Mor10	G, N	5♀, 14♂	Micronecta sp. 1
	Mor11	B	2♀	Micronecta sp. 2
Naucoridae	Mor12	N	2♀, 2♂	Naucoris obsuratus obsuratus Montandon, 1913
	Mor13	B, N, T	5♂	Macrocoris flavicollis flavicollis Signoret, 1861
		A-M	2♂	Macrocoris laticollis laticollis Montandon, 1913
	Mor14	B	1♂	Laccocoris discus Poisson, 1949
	Mor15	BU	1♀	Laccocoris limigenis Stål 1865
Nepidae	Mor16	B	1♀	Laccotrephes dilatatus Montandon, 1895
		BA, M	1♀, 3♂	Laccotrephes fabricii Stål, 1968
	Mor17	AM, M	2♀, 2♂	Laccotrephes calcaratus Montandon, 1898
		BA	1♀, 1♂	Laccotrephes armatus Montandon, 1898
	Mor18	B, G	1♀, 1♂	Laccotrephes latimanus Montandon, 1909
		AM, B	1♀, 1♂	Laccotrephes sp.
	Mor19	A	2♀, 1♂	Ranatra bottegoi Montandon, 1903
	Mor20	B	1♀	Ranatra (Capensis) congoensis Poisson, 1949
Notonectidae	Mor21	AM, BA	7♀, 3♂	Anisops (Micranisops) apicalis Stål, 1855
		A	5♀, 4♂	Anisops (Micranisops) parvulus Brooks, 1952
	Mor22	A, BA	2♀, 3♂	Anisops (s. str.) kampalensis Hutchinson, 1928
	Mor24	G	11♀, 8♂	Anisops (s. str.) jaczewskii Hutchinson, 1928
	Mor23	A	4♂	Anisops (s. str.) sardeus Herrich-Schaeffer, 1849
	Mor25	BA	7♀	Anisops (s. str.) sardeus Herrich-Schaeffer, 1849
		A, T	3♀	Anisops sp.
	Mor26	B	6♀	Enithares glauca Bolivar, 1879
	Mor27	B	2♂	Enithares glauca Bolivar, 1879
	Mor28	AM, A	10♀, 4♂	Enithares sobria Stål, 1855
	Mor29	AM	3♀, 1♂	Nychia marshalli (Scott, 1872)
	MorL14	M	3♀, 1♂	Neonychia congoensis congoensis Hungerford, 1946

Legend

MorAd = Adult Morphotypes; Loc = Sampling sites N/sex = specimens number per sex [a]morphotype code; [b]morphotype descending number ♀ = female;♂ = male

G = Garoua; M = Mbalmayo; A = Akonolinga; S = Santchou; N = Ngaoundére; AM = AbongMbang; T = Tibati; B = Bamenda; Ba = Bankim; Bu = Buea. Bold: absent in the molecular species

Table 3. Relationships between adult morphotypes and species defined by morphological analysis in the Gerromorpha infraorder.

Family	MorAd	Loc	N/ sex	Species name defined by morphological analysis
Gerridae	a	G, M	12♀, 2♂	Limnogonus (s. str.) cereiventris Signoret, 1862
	b Mor31	A, S	4♀, 1♂	Limnogonus (Limnogoïdes) poissoni Andersen, 1973
	Mor32	N	10♀	Limnogonus (Limnogoides) sp.
	Mor33	A	3♀, 1♂	Neogerris severini Kirkaldy, 1900
		AM	2♀, 1♂	Gerris swakopensis Stål, 1858
	Mor34	B	3♀	Eurymetra sp.
	Mor35	N	3♀	Limnogonus (Limnogoïdes) hypoleucus Gerstaecker, 1873
	Mor36	AM, A	2♀, 2♂	Limnogonus (Limnogoïdes) intermedius Poisson, 1941
	Mor37	M	1♂	Rhagadotarsus (Caprivia) hutchinsoni China, 1931
Hydrometridae	Mor38	A, BA	3♀	Hydrometra sp.1
		AM,M	2♀, 2♂	Hydrometra huntchinsoni Hungerford & Evans, 1934
	Mor39	BA, M	1♂	Hydrometra albolineata Reuter, 1882
		G	2♀	Hydrometra sp.2
Mesoveliidae	Mor40	A, BA	5♂	Mesovelia sp.
	Mor41	G, T	4♀, 1♂	Mesovelia sp.
	Mor42	M, N	7♂, 10♀	Mesovelia vigittigera Horvath, 1895
Veliidae	Mor43	AM, A	3♀, 5♂	Angilia sp.
	Mor44	AM, B	1♀, 2♂	Rhagovelia sp.1
	Mor48	AM	1♂	Rhagovelia sp. 1
	Mor45	T	3♀	Rhagovelia sp. 2
	Mor46	G, N	11♀, 7♂	Rhagovelia sp. 2
	Mor47	S	4♀, 1♂	Rhagovelia sp. 3
Hebridae	Mor49	A	2♀	Hebrus sp.
	Mor30	A	2♀	Hebrus sp

Legend

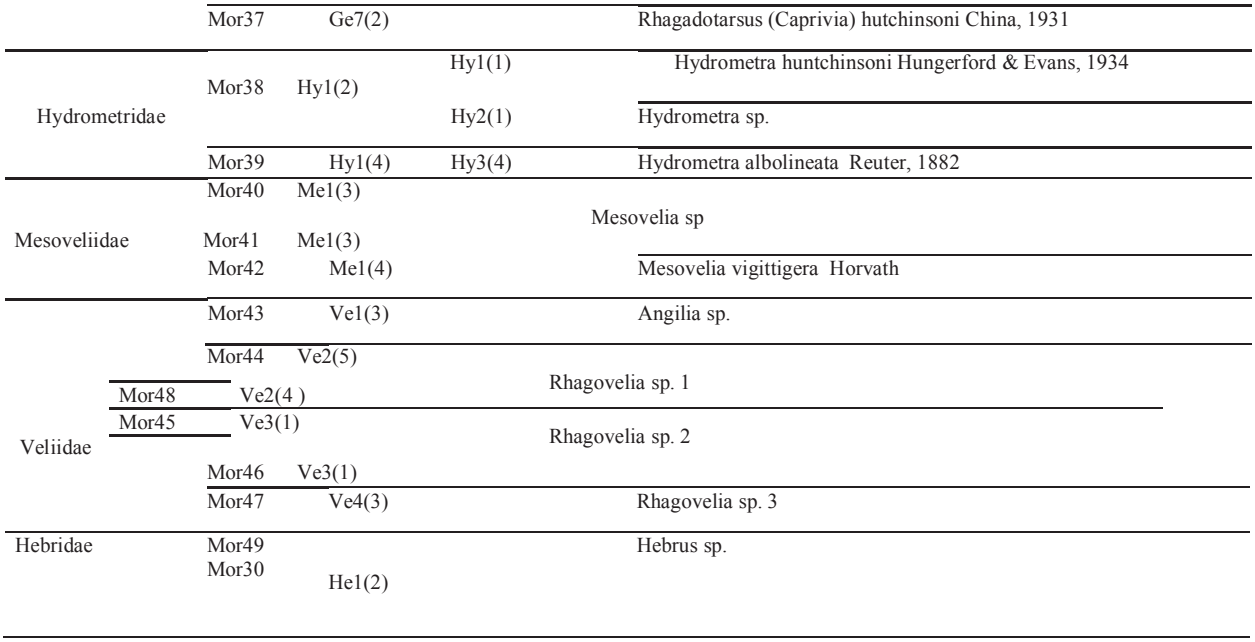
MorAd = Adult Morphotypes Loc = Sampling sites N/sex = specimens number per sex [a]morphotype code [b]morphotype descending number ; ♀ = female ; ♂ = male

G = Garoua; M = Mbalmayo; A = Akonolinga; S = Santchou; N = Ngaoundére; AM = AbongMbang; T = Tibati; B = Bamenda; Ba = Bankim; Bu = Buea.

Bold: absent in the molecular species

Table 4. Putative molecular species and morphological species for adult morphotypes according to families.

Family	Mor	ABGD p1	ABGD p2	ABGD p3	Associated species names defined by morphological
Belostomatidae	Mor1	B1(4)			Appasus grassei grassei (Poisson, 1937)
	Mor2	B3(8)			Appasus nepoides (Fabricius, 1803)
	Mor3	B4(4)			Appasus procerus procerus (Gerstaecker, 1873)
	Mor4	B5(3)			Appasus ampliatus (Bergroth, 1890)
	Mor5	B6(3)			Limnogeton fieberi (Mayr, 1953)
	Mor6	B7(2)			Hydrocyrius nanus (Montandon, 1907)
	Mor7	B8(4)	B8(3)		Hydrocyrius colombiae colombiae (Spinola, 1852)
				B2(1)	No morphological species associated
Corixidae	Mor9	C1(4)			Sigara (Tropocorixa) sp.
Micronectidae	Mor10	C2(4)			Micronecta sp. 1
	Mor11	C3(3)			Micronecta sp. 2
Naucoridae	Mor12	Na1(4)			Naucoris obsuratus obsuratus Montandon, 1913
	Mor13	Na2(4)			Macrocoris flavicollis flavicollis Signoret, 1861
	Mor14	Na3(4)			Laccocoris discus Poisson, 1949
	Mor15	Na4(2)			Laccocoris limigenis Stål, 1865
Nepidae	Mor16	Nm1(4)			Laccotrephes fabricii Stål, 1968
	Mor17	Nm2(1)			Laccotrephes calcaratus Montandon, 1898
	Mor19	Nr1(2)			Ranatra bottegoi Montandon, 1903
	Mor20	Nr2(2)			Ranatra (Capensis) congoensis Poisson, 1949
Notonectidae	Mor21	No1(4)			Anisops (Micranisops) parvulus Brooks, 1952
	Mor22	No2(3)			Anisops (s. str.) kampalensis Hutchinson, 1928
	Mor23	No3(2)			Anisops (s. str.) sardeus Herrich-Schaeffer, 1849
	Mor24	No4(2)			Anisops (s. str.) jaczewskii Hutchinson, 1928
	Mor26	No8(3)			Enithares glauca Bolivar, 1879
	Mor27	No8(1)			
	Mor28	No5(1)			No morphological species associated
	Mor29	No6(3)			Enithares sobria Stål, 1855
		No7(4)			Nychia marshalli (Scott, 1872)
Gerridae	Mor31	Ge1(2)	Ge1(1)		Limnogonus (s. str.) cereiventris Signoret, 1862
	Mor31	Ge2(2			Limnogonus (Limnogoïdes) sp. (poissoni?)
	Mor32	Ge2(2)			
	Mor34	Ge5(3)			Eurymetra sp.
	Mor35	Ge6(4)			Limnogonus (Limnogoïdes) hypoleucus Gerstaecker, 1873
	Mor36	Ge4(1)			No morphological species associated
		Ge3(3)			Limnogonus (Limnogoides) intermidus Poisson, 1641



Note. Mor : Morphotype code following, ABGD : ABGD putative species with the partitions p1 (p=0.0359), p2 (p=0.0046) and p3 (p=0.0028). The number of specimens examined is given in parentheses.

According to the gap-value used, 11 (p = 3.59%) to 17 (p=0.28%) molecular species could be recognize for the nymph morphotypes. If we considered the p3 partition (p=0.28%), out the 14 a priori morphological morphotypes, eight could be assigned to a single molecular species. The morphotypes, MorL2, MorL4, and MorL8, were split into two or three species. The two morphotypes and MorL10 and MorL11 were merged into one (Table 5). The molecular study of the sample nymphs allowed to identify 11 species for which adults were also identified and four additional species. (Table 5) shows the assignments of nymph molecular species to adult molecular species and the a posteriori species names associated to the corresponding adult determined based on morphology.

Table 5. Assignments of nymph morphotypes to adult morphotypes determined by molecular identification and a posteriori species names associated to the corresponding adult as determined based on morphology (Tables 1 and 2).

Family	MorL[1]	ABGD p1 [2]	ABGD P2 [3]	ABGD P3 [4]	MolAd [5]	Morphological species determined a posteriori
Belostomatidae	MorL1	ML1(4)			B3	*Appasus nepoides* (Fabricius, 1803)
	MorL2	ML2(4)		ML2(2)	B8	*Hydrocyrius colombiae colombiae* Spinola, 1852
				ML3(1)	**No adult**	**No morphological species associated**
				ML4(1)	**No adult**	**No morphological species associated**
	MorL3	ML5(4)			B6	*Limnogeton fieberi* Mayr, 1953
	MorL4	ML6(3)	ML6(3)		B5	*Appasus ampliatus* Bergroth, 1890
		ML7(1)	ML7(1)		B2	**No morphological species associated**
Naucoridae	MorL5	ML8(4)			Na2	*Macrocoris flavicollis flavicollis* Signoret, 1861
Nepidae	MorL6	ML9 (1)			Nm1	*Laccotrephes fabricii* Stål, 1968
	MorL7	ML10(3)			Nm2	*Laccotrephes calcaratus* Montandon, 1898
Notonectidae	MorL8			ML12(1)	**No adult**	**No morphological species associated**
		ML11(2)		ML13(1)	**No5**	**No morphological species associated**
	MorL9	ML11(1)				
	MorL10	ML14(1)			No6	*Enithares sobria* Stål, 1855
	MorL11	ML14(1)				
	MorL12	ML15(4)			No1	*Anisops (Micranisops) parvulus* Brooks, 1952
	MorL13	ML16(4)			No7	*Nychia marshalli* (Scott, 1872)
Mesoveliidae	MorL14	ML17(2)			**No adult**	**No morphological species associated**

MolNy = Nymph Morphotype code
(N) = number of specimens per morphotype
MolAd = Adult molecular putative species code

Morphological and molecular aquatic bugs species biodiversity in Cameroon

For the first set of samples, based on morphological criteria 54 species were determined and for the second set (adults and nymphs), 52-62 species were putatively delimited using COI molecular marker. Nine species were lacking from the molecular sampling and if we consider the partition p3, 8 putative molecular species have no morphological species associated (Tables 4-5). But, for the adults, we observed a good congruence between the morphologic and the molecular study for the determination of the a priori morphotypes. In some cases, the a priori determination of morphotypes lead to recognize two species while only one was assessed by the two methods as for two cases in Veliidae (Mor44-48, Mor 45-46), Notonectidae (Mor26-27) and Hebridae (Mor30-49). By contrast, two species were recognized by the two methods for a single a priori morphological species in Gerridae (Mor31, Mor33), Hydrometridae (Mor38). However, some discrepancies are noticed for Gerridae (Mor31-32) and Mesoveliidae (Mor40-41-42).

If we validate all the morphological species and the molecular species for which no morphological species was associated, the combination of the two dataset (morphologic and molecular) give a total of 62 aquatic bugs species in Cameroon.

The species biodiversity of aquatic bugs varies among identified families. The most diversified families are Notonectidae (13 species), Belostomatidae (11 species), Gerridae (10

species) and Nepidae (8 species). Other families with intermediate diversity are: Micronectidae (2 species), Mesoveliidae (3 species), Hydrometridae and Veliidae (4 species for each family) and Naucoridae (5 species). Corixidae and Hebridae are the least diversified families with only one identified species each (Tables 6).

Table 6: Checklist of aquatic bugs reported from Cameroon

Infraorder	Family	Previously reported from Cameroon		Present study			Checklist of aquatic bugs of Cameroon	
		Genera	Species[1]	Genera	Species[2] (N)	New report species (Putatively new species)[3]	Genera	Species[4]
Leptopodomorpha	Leptopodidae	0	0	0	0	0 (0)	0	0
	Saldidae	0	0	0	0	0 (0)	0	0
Gerromorpha	Gerridae	5	21	5	9(10)	4 (2)	12	24
	Hydrometridae	1	5	1	4(4)	3 (2)	1	8
	Hebridae	1	3	1	1(1)	1 (1)	1	4
	Macroveliidae	0	0	0	0	0 (0)	0	0
	Mesoveliidae	1	3	1	2(3)	2 (2)	1	5
	Veliidae	8	20	2	4(4)	4 (4)	8	24
	Paraphrynoveliidae	0	0	0	0	0 (0)	0	0
Nepomorpha	Aphelochoridae	1	1	0	0	0 (0)	1	1
	Belostomatidae	4	6	4	8 (11)	3 (0)	4	9
	Corixidae	2	3	1	1(1)	0 (0)	2	3
	Gelastocoridae	0	0	0	0	0 (0)	0	0
	Helotrephidae	1	1	0	0	0 (0)	1	1
	Micronectidae	1	3	1	2(2)	2 (2)	1	5
	Naucoridae	2	6	2	5(5)	1 (0)	4	7
	Nepidae	3	8	2	8(8)	8 (1)	3	16
	Notonectidae	4	13	4	10(13)	6 (1)	4	19
	Ochteridae	1	1	0	0	0 (0)	1	1
	Pleidae	1	1	0	0	0 (0)	1	1
	Potamocoridae	0	0	0	0	0 (0)	0	0
	Total	**36**	**95**	**24**	**54(62)**	**34 (14)**	**45**	**128**

[3-5,31-33,41,42]
Putatively new species = species identified at genera level

Discussion

This study complements the work realized by Poisson [3-5] on the diversity of aquatic Heteroptera in Cameroon. In view of the rising worry regarding the potential importance of aquatic bugs in the transmission of the emergent disease Buruli ulcer [6-10], this most up-to-date estimation of aquatic bugs biodiversity is especially relevant. Aquatic bugs biodiversity of Cameroon previously reported by Poisson [3-5,31-33,41,42] reached 15 families including 95 species. Including our dataset, we reported in this country 9 new genera and 34 new species records including 14 putative new species. In the all, 45 genera and 125 species of true aquatic and sub-aquatic bugs must be considered in Cameroon (Table 6).

This study underlines the difficulty in identifying the right species based on classical literature in the field without access to museum collections and connection with expert taxonomists. There is a divergence between the number of morphotypes determined a priori in the field by non-experts relying on basic identification keys and the morphological analysis carried out by taxonomists from the museum specialized in aquatic bugs. This difference in expertise explains why different morphological species could not be distinguished in the field as different morphotypes and vice versa. In bugs, identification at the species level is difficult in some families, such as Mesoveliidae and Veliidae, and usually requires the presence of males. Moreover, some species have different morphological characteristics in males and females for example at A. sardeus and E. glauca males and females were initially classified into different morphotypes (Table1). Moreover, taxonomical keys are lacking to differentiate the nymphal stages. Additional specimens from both sexes and further studies, including possible generic revisions, are needed in order to confirm the status of the putative new species.

The use of molecular species delimitation method allows to estimate the specific richness and especially whatever the stage or the sex of the sample. Generally, there was a good correspondence between morphological species a priori identified from adult morphotypes and molecular putative species with a few exceptions.

Even though in most cases there is congruence between the morphological and molecular species, there are exceptions. Previously, in their work on true water bugs, [17] described similar results where the COI barcode for each species formed a cluster different from the neighboring species with some exceptions. In some cases, they noted a large unusual intra-specific genetic distance and in some others a very small distance between species. Molecular identification allows the association of immature stages to adult stages. All nymphal morphotypes could be assigned to an adult morphotypes using this method except ML2, ML11 and ML17 (Table5).

In the case of a lack of corresponding molecular species in some morphological species, this could be due to the reduced number of specimens (188) used for the molecular analysis compared to the number of specimens (309) used for the morphological analyses. An explanation for sharing the same molecular putative species between different morphological species is thatusing a single gene could miss instances of very recent speciations caused by selection at a few number of loci because a drastic change in morphology could be due to a few genes among which COI is not included. In other words, the “neutral” marker COI might not carry any record of species divergence in that case. Another explanation could be the fact that COI is a mitochondrial gene; it could have introgressed into another species after some hybridization

events between the two species. Another hypothesis is that the species based on molecular marker are real but several morphotypes are present within one species.

It is better to complement this type of study with phylogenetic analyses to determine relationships between species or group of species, but due to the limited sampling size of our study and the use of a single mitochondrial gene that is not intended for building phylogeny, we performed only the separation of the molecular species within the families of aquatic bugs identified. Previous works, based on many loci described the phylogenetic relationships of the aquatic bugs more accurately [43] used 16S, 28S and COI/COII whereas [44] used 37 mitochondrial loci to obtain a well-resolved phylogeny of the true aquatic bugs but these studies concerned Europe, USA, Australia, Philippines, Madagascar and Vietnam whereas the present study is the first in the Afrotropical region.

Conclusion

This study improves our knowledge on the diversity and distribution of aquatic bugs in Cameroon and confirms that COI can reliably be used to identify species in most families of aquatic bugs described here appear of the few exceptions observed. In the near future, it should also help to routinely identify aquatic bug species of importance in the transmission of the bacillus causing Buruli ulcer in human in the tropical region.

This pioneering study will be extended to other Afrotropical region to better document the biodiversity of aquatic bugs in this part of the world.

Acknowledgments

We thank the staff of the Mycobacteriology Service at Centre Pasteur in Cameroon for their invaluable help throughout; the EGCE research team at Gif-Sur-Yvette for their help in discussion; the MNHN, Paris for morphological species identification particularly Laurent Fauve for his availability as well as José Ricardo RIBEIRO for help in the determination of Belostomas' genitalia; and the MIVEGEC at Montpellier for research assistance.

References

1. Polhemus JT, Polhemus DA (2007) Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. . Hydrobiologia 595: 379 - 391.

2. Poisson R (1941) Voyage de M. L. Chopard en Côte d'Ivoire (1938-39) - Hémiptères aquatiques. Rev Fr Entomol 8: 77-82.

3. Poisson R (1929) Contribution à la faune du Cameroun Hémiptères aquatiques. Faune Colon Fr 3: 135–164.

4. Poisson R (1937) Voyage de M. P.-P. Grassé en Afrique Occidentale Francaise. Hemiptera aquatica. Ann Soc Entomol Fr 106: 115–132.

5. Poisson R (1948) Hydrocorises du Cameroun. Mission J. Carayon 1947. Rev Fr Entomol 3: 167–177.

6. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, et al. (2010) Seasonal and Regional Dynamics of M. ulcerans Transmission in Environmental Context: Deciphering the Role of Water Bugs as Hosts and Vectors. PLoS Negleted Tropical Deseases 4: 1-10.

7. Marsollier L, Robert R, Aubry J, André J-PS, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic Insects as a Vector for Mycobacterium ulcerans Applied and Environmental Microbiology 68: 46234628.

8. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, et al. (2011) Geographic Expansion of Buruli Ulcer Disease, Cameroon. Emerg Infect Dis 17: 551–553.

9. Ebong SMA, Eyangoh S, Marion E, Landier J, Marsollier L, et al. (2012) Survey of water bugs in Bankim, a new Buruli ulcer endemic area in Cameroon. . Journal of Tropical Medicine: 1-8.

10. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne P-A, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection The Lancet 353: 986.

11. Mosi L, Williamson H, Wallace JR, Merritt RW, Small PLC (2008) Persistent Association of Mycobacterium ulcerans with West African Predaceous Insects of the Family Belostomatidae. Applied and Environmental Microbiology 74: 7036-7042.

12. Fleck G, Brenk M, Misof B (2006) DNA Taxonomy and the identification of immature insect stages: the true larva of Tauriphila argo (Hagen 1869) (Odonata: Anisoptera: Libellulidae). Ann soc entomol Fr 42: 91-98.

13. Wheeler WC, Schuh RT, Bang R (1993) Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. Entomol Scand 24: 121–137.
14. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci 270: 313–321.

15. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc R Soc Lond B Biol Sci 270: 96–99.

16. Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol Amp Evol 18: 70–74.

17. Park D-S, Foottit R, Maw E, Hebert PDN (2011) Barcoding Bugs: DNA-Based Identification of the True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). PLoS ONE 6: 1-9.

18. Sethusa MT, Millar IM, Yessoufou K, Jacobs A, Bank MVd, et al. (2014) DNA barcode efficacy for the identification of economically important scale insects (Hemiptera: Coccoidea) in South Africa. African Entomology 22: 257-266.

19. Foottit RG, Maw E, Hebert PDN (2014) DNA Barcodes for Nearctic Auchenorrhyncha (Insecta: Hemiptera). PloS one 9: 1-30.

20. Damgaard J (2008) MtDNA diversity and species phylogeny of western Palaearctic members of the Gerris lacustris group (Hemiptera-Heteroptera: Gerridae) with implications for "DNA barcoding" of water striders. Insect Syst Evol 39: 107–120.

21. Memon N, Meier R, Manan A, Su KF-Y (2006) On the use of DNA sequences for determining the species limits of a polymorphic new species in the stink bug genus Halys (Heteroptera: Pentatomidae) from Pakistan. Syst Entomol 31: 703–710.

22. Jung S, Duwal RK, Lee S (2001) COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). Mol Ecol Resour 11: 266–270.

23. Castanhole MMU, Marchesin SRC, Pereira LLV, Moreira FFF, Barbosa JF, et al. (2013) The first assess of the haplotypes from COI gene sequences in species of spittlebugs (Cicadomorpha: Hemiptera) and aquatic true bugs (Gerromorpha and Nepomorpha: Hemiptera) in Brazil. Genetics and molecular research: GMR 12: 5372- 5381.

24. Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation Mol Ecol 21: 1864–1877.

25. Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. Syst Biol 62: 707–724.

26. Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis. A (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. Bioinforma Oxf Engl 29: 2869–2876.

27. Schuh RT, Slater JA (1988) True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) classification and Natural History. Cornell University Press, Ithaca and London: 1-336p.

28. Poisson R (1952) Contribution à la l'étude des Hydrcorises de Madagascar (Mission J. Millot et R. Paulian 1949). Institut Scinetifique de Madagascar 1: 24-70.

29. Poisson R (1955) Quelques Hydrocorises nouveaux de l'Afrique du Sud (Mission Suédoise Brink et Rüdebeck). Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne 30: 129 - 140.

30. Poisson R (1956) Contribution à la l'étude des Hydrcorises de Madagascar (Heteroptera) Mem Institut Scientifique de Madagascar 8: 244-265.

31. Poisson R (1965a) Catalogue des Hétéroptères Hydrocorises africano-malgaches de la famille des Nepidae (Ltreille) 1802. Bulletin de l' IFAN Tmoe XXVII: 229-269.

32. Poisson R (1965b) Catalogue des Insectes Hétéroptères Gerridae Leach, 1807s africanomalgaches Bulletin de l' IFAN Tome XXVII: 1466 -1503.

33. Poisson R (1966) Catalogue des Insectes Hétéroptères Notonectidae Leach, 1815 africanomalgaches. Bulletin de l' IFAN 28: 729-768.

34. Andersen NM (1982) The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. Entomonograph 3: 1-455.

35. Andersen NM, Weir TA (2004) Australien Water bugs their biology and identification (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha & Nepomorpha). Entomograph 14: 1-396.

36. Chen P-p, Nieser N, Zettel H (2005) The aquatic and semi-aquatic bugs (Heteroptera: Nepomorpha and Gerromorpha) of Malesia. Fauna Malesiana Handbook 5: 1 - 546.

37. Macherey-Nagel® (2012) NucleoSpin, Tissue Genomic DNA from tissue. User manual: 1-50.

38. Folmer O, Black M, Hoeh W, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294-299.

39. Affymetrix® (2012) USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup. User manual: 1-4.

40. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28: 2731-2739.

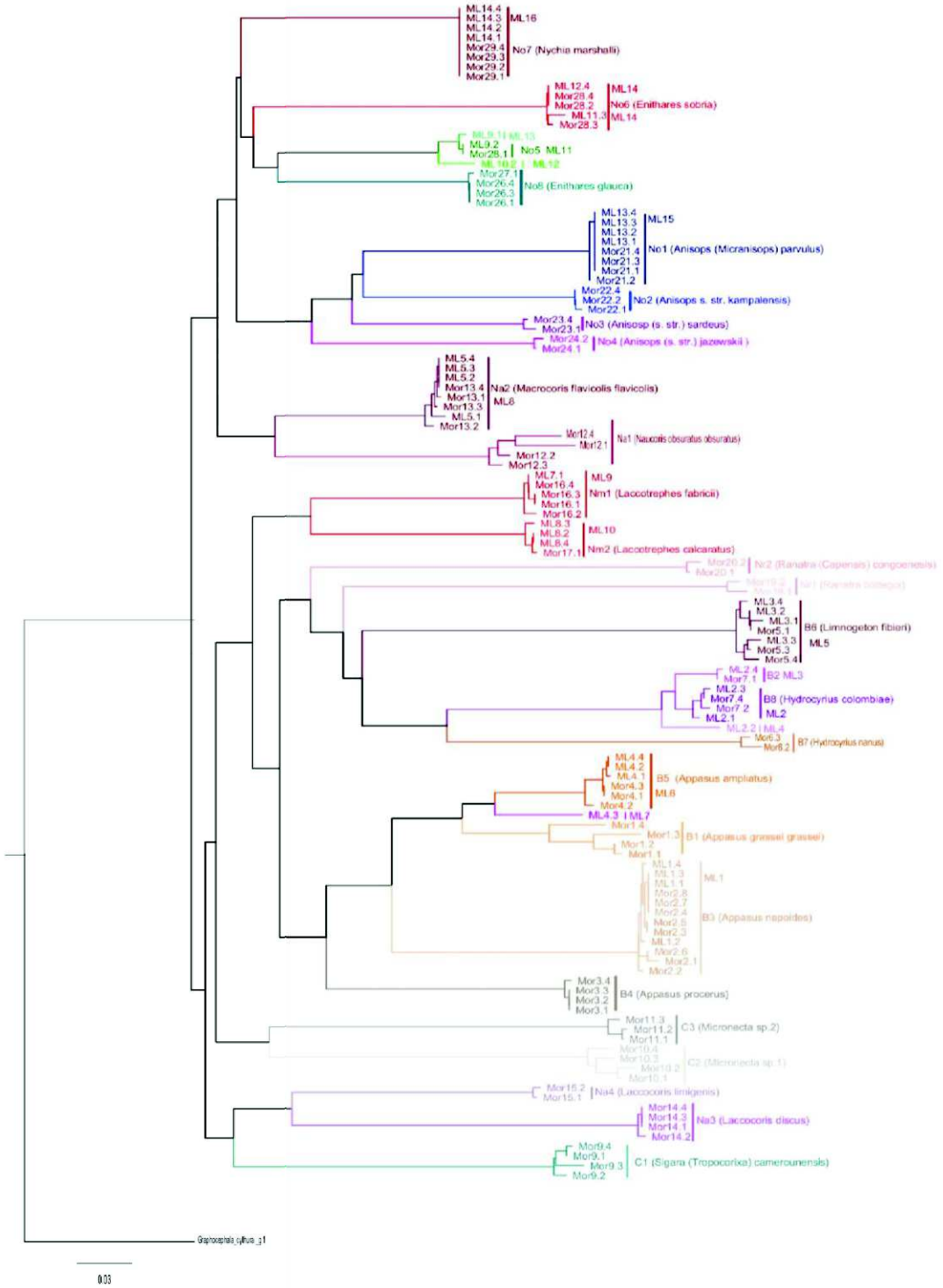
41. Medler JT (1980) Insects of Nigeria - check list and bibliography. Memoirs of the American Entomological Institute (Gainesville) 30: 1-919.

42. Linnavouari R (1971) Hemiptera of Soudan, with remarks on some species of the adjacent countries.1. The aquatic and subaquatic families. Ann Zool Fennici 8: 349-366.

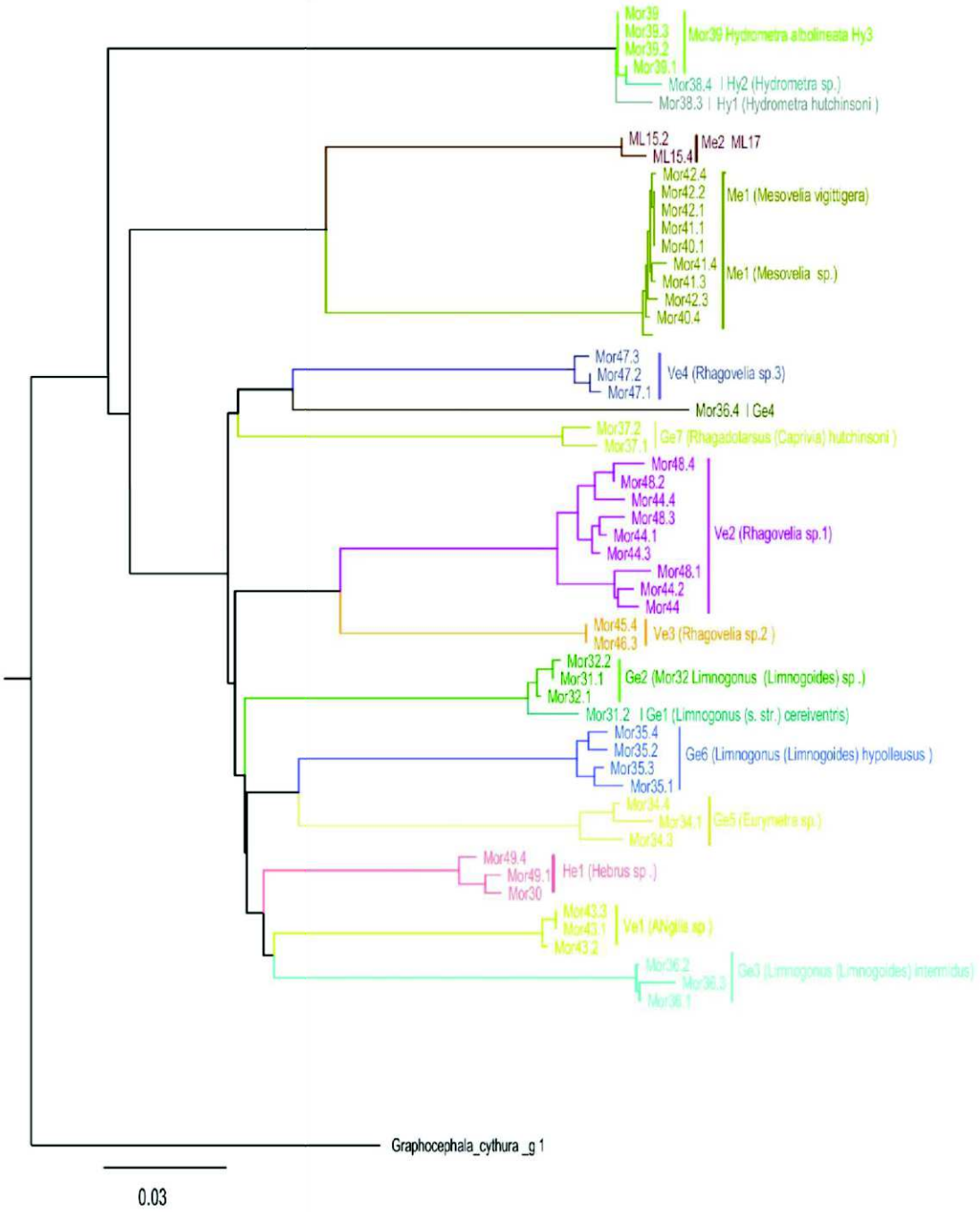
43. Hebsgaard MB, Andersen NM, Damgaard J (2004) Phylogeny of the true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera–Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology. Syst Entomol 29: 488–508.

44. Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q, et al. (2009) Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. BMC Evol Biol 9: 1-11.

Supporting information



S1 Fig. Molecular putative species delimited by ABGD according to aquatic bugfamilies using partition 1 in Nepomorpha infra-order.



S2 Fig. Molecular putative species delimited by ABGD according to aquatic bugfamilies using partition 1 in Gerromorpha infra-order.

Each color represents one aquatic bug family

CHAPITRE 3

Caractérisation phylogéographique et biogéographique despunaises aquatiques du Cameroun

L'ulcère de Buruli reste une maladie énigmatique car le mode exact de transmission de la mycobactérie à l'homme est jusqu'à présent mal connu. Cependant, *M. ulcerans* a été détecté chez une large gamme d'hôtes aquatiques [42,102] y compris quelques taxons de punaises aquatiques notamment des familles de Belostomatidae et Naucoridae [31,35,103].

Dans ce chapitre, nous avons étudié les caractéristiques biogéographiques et écologiques des punaises aquatiques qui pourraient favoriser l'acquisition de *M. ulcerans* chez certains taxons et non chez d'autres. Ainsi des analyses ont été faites en utilisant les séquences issues des taxons de punaises aquatiques collectés dans les différents biomes (zones agro-écologiques) rencontrées au Cameroun [104]. Les différents outils de bio-informatique utilisés pour ces analyses nous ont permis de faire une étude comparée de la phylogéographie de ces insectes au Cameroun. Et de détecter les caractères biogéographiques et écologiques qui favoriseraient l'acquisition de la mycobactérie par certains taxons de punaises aquatiques. Les résultats obtenus sont contenus dans les articles 2 et 3 suivants :

Article3 : *Mycobacterium ulcerans* acquisition by aquatic Heteropterans (or bugs) is driven by complex interplays between biogeographical and ecological characteristics

Solange Meyin A Ebong, François Chevenet, Guillaume Castel, Laurent Marsollier, Philippe Le Gall, Sara Eyangoh, Jean-François Guégan

Article en prépation

Mycobacterium ulcerans acquisition by aquatic Heteropterans is driven by complex interplays between biogeographical and ecological characteristics

Solange Meyin A Ebong[1,2,3], Guillaume Castel[4,5], François Chevenet[1], Laurent Marsollier[6], Albert Samé Ekobo[8], Philippe Le Gall[7], Sara Eyangoh[2], Jean-François Guégan[1]

[1] UMR MIVEGEC IRD, CNRS, Université de Montpellier, Centre IRD de Montpellier, France

[2] Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274 Yaoundé, Cameroon

[3] Université de Yaoundé I, Laboratoire de Parasitologie et Ecologie, Faculté des Sciences, Yaoundé, Cameroon

[4] INRA, UMR 1062 CBGP, F-34988 Montferrier-sur-Lez, France

[5]Institut de Biologie Computationnelle, 34095 Montpellier, France

[6] Inserm Avenir ATOMycA CRCNA Inserm U892 & CNRS U6299, Université et CHU d'Angers, France

[7] IRD UR 072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 Gif sur Yvette Cedex, France et Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France

[8] Université de Yaoundé I, Faculté de Médecine et de Sciences Biomédical, Yaoundé Cameroun.

Abstract

The Heteroptera, a sub-order of Hemiptera, are divided into seven infraorders and 3 have developed adaptive traits for living in aquatic environment. These adaptations correspond to the ecological traits of aquatic bugs. This study aimed to show if *M. ulcerans* acquisition by aquatic Heteroptera is driven by complex interplays between their biogeographical and ecological characteristics. Firstly two approaches (Bayesian and maximum likelihood) are used to reconstruct the phylogenetic relationships among aquatic Heteroptera taxa collected in Cameroon based on 171 sequences of a portion of mitochondrial gene coding for the first subunit of cytochrome oxidase (COI) from these insects. Secondly, we used Bayesian method (BEAST) and parsimony (PhyloType) to perform and study the ancestral characters reconstruction of aquatic Heteroptera taxa according to the agro-ecological zones (biomes) of Cameroon where they have been collected, and the combinations of several ecological traits under study (type of habitats, feeding habits, flying capacity). the role played by biogeography and ecological characteristics of the different Heteropteran taxa in explaining the presence of *M. ulcerans* in some specific lineages of aquatic Heteroptera was studied using the comparative analyse on different combinations of these characteristics.

Regardless of the approach, we obtained i) Nepomorpha appear as a monophyletic group while Gerromorpha considered here as the ancestors of Nepomorpha are a paraphyletic group; ii) the biome "Zone 2" corresponding to the high Guinea savannah zone consists of the Adamawa Plateau, the starting point for most of the rivers of Cameroon facilitate the movement of aquatic organisms including aquatic Heteroptera which would spread from zone2 to other biomes; iii) 5 combinations of ancestral annotations show the *M. ulcerans* signal initially absent, but that appears in the lineages of taxa belonging to the Naucoridae and Belostomatidae families. The same combinations are obtained in aquatic Heteroptera phylotypes identified in the biomes zones1, Zone 2, Zone 3 and Zone 5. The biome Zone 4 which was absent in these combinations seem not to offer the conditions for the growth and persistence of *M. ulcerans* in its environment. Some ecological traits such as living on aquatic vegetation and feed on macropreys seem to facilitate the acquisition of *M. ulcerans* in the aquatic environment while the flying capacity that is indirectly involved in the acquisition of *M. ulcerans* appears to facilitate the dissemination of it by contaminating new environment. So the presence of the *M. ulcerans* signal in some taxa of aquatic Heteroptera is due to the acquisition in the contaminated aquatic environment that would be facilitated by some ecological traits of these.

Keys words: Aquatic heteroptera, ecological traits, comparative analysis, Buruli ulcer, *Mycobacterium ulcerans*, transmission, Africa

Introduction

Heteroptera or true bugs, a sub-order of Hemiptera order, are divided into seven infraorders and three of them (Nepomorpha, Gerromorpha and Leptopodomorpha) are found in aquatic and sub-aquatic environments in all continents except Antarctica [1]. Even if the taxonomy and systematic of Heteroptera were subject of several works during the last two centuries, however, it is only in 1978 that Cobben has revised the scheme of the evolutionary history of this group of arthropods. Schuh [2] presented the first documented higher-level phylogeny for the seven infraorders of Heteroptera chiefly based upon morphological characters. Other works carried out after analyzed more specifically the phylogeny of Gerromorpha and Nepomorpha on the basis of the morphology and structure of internal organs mainly in Australia and Malaisia [3-5]. Nowadays, molecular markers are increasingly used to study the evolutionary history of living organisms [35]. Concerning bugs, Damgaard [3-5] has studied the phylogeny of many groups in Gerromorpha infraorders using molecular data set from nuclear and mitochondrial genes [6-8].

In the Afro-tropical region, no studies on the phylogeny of aquatic Heteroptera was made. Except the old works of Poisson on aquatic Heteroptera of Afro-tropical and Malagasy regions [914], theseinsects were ignored of the entomological studies for decades. But since the 2000's, a resurging interest has grown documenting the species of aquatic Heteroptera inhabiting Cameroon because some species were suspected to be implicated in the transmission of *Mycobacterium ulcerans*, the causal agent of an emerging human disease named Buruli ulcer [15-19].

In this study, we used firstly two approaches based both on Bayesian (BEAST) [20] and on maximum likelihood (PhyML) [21] methods to reconstruct the phylogenetic relationships among aquatic Heteroptera taxa collected in Cameroon, Central Africa. Secondly, we used Bayesian method (BEAST) [20] and parsimony (PhyloType) [22] to perform and study the ancestral characters reconstruction of aquatic Heteroptera taxa according to the agro-ecological zones (biomes) of Cameroon where they have been collected, and the combinations of several ecological traits under study. Using comparative analyses, we examined the role played by biogeography and ecological characteristics of the different Heteropteran taxa in explaining the presence of Mycobacterium ulcerans in some specific lineages of aquatic Heteroptera. Because two aquatic Heteroptera groups, i.e. Belostomatidae and Naucoridae, are suspected to be involved in the transmission of the bacillus to human and then caused the disease, the present work is developing an innovative comparative approach to analyze the respective influence of phylogenetic relatedness, biogeography and ecological conditions in the acquisition of the disease agent by these aquatic insects. These new findings shed light on the important role played by both biogeography and ecological traits in the acquisition of the mycobacterium from the environment by these insects, thus supporting the view that these aquatic insects may accidentally participate to the disease agent life-cycle as opportunistic hosts.

Material and methods

Sampling of aquatic Heteroptera across Cameroon, central Africa

All aquatic Heteroptera specimens used in this study were collected in different agroecological zones (biomes) of Cameroon (Figure 1). Cameroon, a central African country, has a great diversity of soil conditions, climates and therefore a diversity of ecosystems that contain as rich and diversified animals and plants. On the agricultural plan, the diversity of landscapes, soil and climate conditions allow to subdivide Cameroon into 5 main agro-ecological zones called as biomesin this study [23]. A total of 22,375 specimens and 54 speciesofaquatic Heteroptera were collected using two sampling methods: directly in the aquatic environment with hauling a net (32 × 32 cm and 1 mm in mesh size), and indirectly by using light trapping to capture winged imagoes (see Ebong et al., in review for further details). Aquatic sampling was performed in triplicate each month, on three consecutive mornings. Light traps were installed twice a month in each site from 6:30PM to 11:00PM. Two survey periods were realized in 2011 (March to June) and 2012-2013 (September 2012 to February 2013). After collection, adults and nymphs were selected, counted, and preserved in 70% alcohol for further analysis.

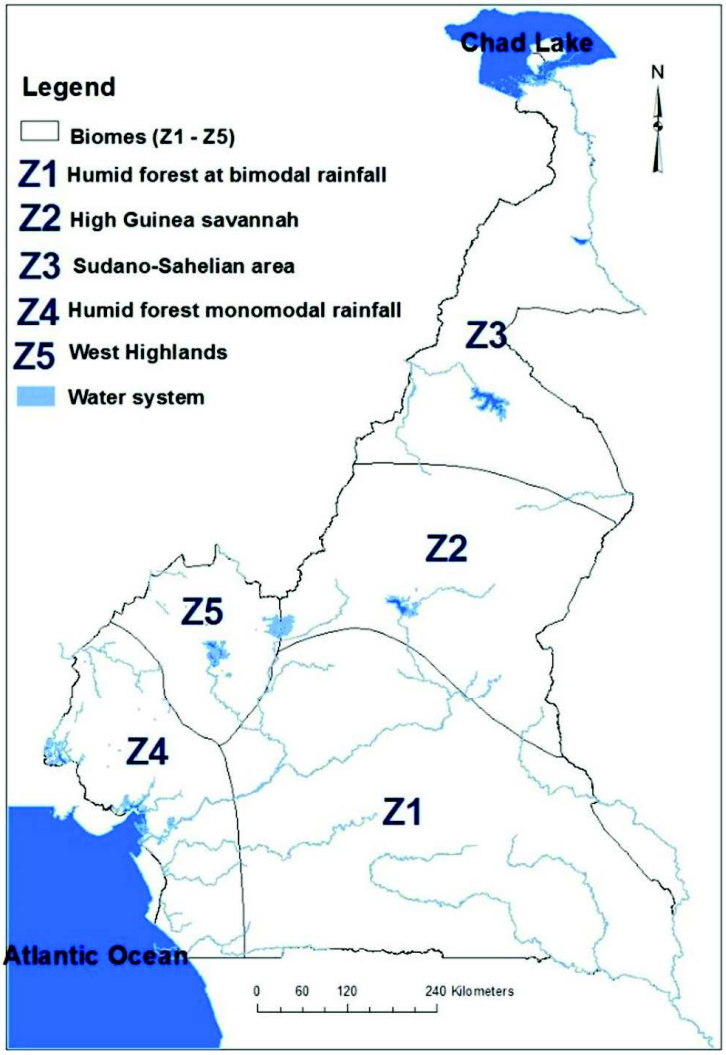


Figure 1. Map of Cameroon showing the different agro-ecological zones (biomes) according to the different sampling sites surveyed.

Phylogeny of aquatic Heteroptera

We used a fragment of the mitochondrialgene coding to the first subunit of cytochrome oxidase (COI) (see also Ebong et al. in review). Total DNA was extracted from legs or full body for small insects, using the NucleoSpin® Tissue XS [24] according to the manufacturers' instructions. PCR amplifications were done in 20 µl reaction volumes containing 10 µM of each dNTP (Promega), 10 µM of each primer, 0.5 U of Taq DNA Polymerase (Promega), 1× PCR Buffer (Promega), and 1µl of DNA extract. The gene fragments (COI) were amplified with the pairs of primers LCO 5'-GGT-CAACAAATCAAAAGATATTGG-3' and HCO 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAA-ATCA-3' [25]. PCR always started with a denaturation step of 94°C for five minutes, followed by 25 cycles of one minute denaturation at 94°C, 1.5 minutes annealing at 50°C and one minute elongation at 72°C, and ended with a 10 minutes final elongation at 72°C. PCR products were cleaned by Exosap-IT [26], a single-step enzymatic clean up that eliminates unincorporated primers and dNTPs. The cleaned products were then sequenced to 690 bp nucleotides. Multiple alignments were made using Clustal W according to the default settings: full multiple alignments with bootstrap number equal to 1000. Finally, we obtained 171 COI homologous sequences data set of 669bp. We corroborated the (99%) homology of our sequences with COI sequences obtained from BLAST-GenBank [27], and added to our data set three additional sequences external to Heteroptera to enable us to direct the phylogenetic tree in time by rooting on these three taxa: Cicadella sp., Graphocephala atropunctata and Graphocephala cytura. References to these three genes in GenBank are respectively: gi262073319, gi227937213 and gi227937233.

We then reconstructed the phylogenetic relationships between aquatic Heteroptera taxa identified in this study using the 171sequences data set described above, added to the three outgroup sequences from Genbank. The best substitution model of nucleotide sequences for these sequences data set (SM1) was identified as GTR+I+G model (General Time Reversible + Invariant + Gamma) by using JModelTest [28] and Akaike's test (see SM1 for further details). Phylogenetic tree calculation was firstly implemented with PhyML 3.0 [21] using the maximum likelihood method and default settings. The reliability for internal branch was assessed using the aLRT test (approximate Likelihood Ratio Test) [29]. Phylogenetics trees were visualized using Treedyn [30] (see Figure 2).

Secondly, phylogenetic tree was calculated using the Beast v1.8.0 programs with Bayesian MCMC method [20]. BEAUTi v1.8.0 was used to define parameter settings. As with PhyML, a GTR+G+I substitution model was used. A lognormal relaxed clock allowing branch lengths to vary according to an uncorrelated lognormal distribution, a coalescent Bayesian skyline tree prior and a random tree as starting tree were used for this analysis [31]. All other priors were left to the default settings. We ran two independent analyses of 50 million generations with parameters sampled every 1000 generations. Parameters were evaluated using Tracer v1.5 and summary maximum clade credibility trees (MCC) were generated using TREE ANNOTATOR v1.8.0 after discarding the first 10% of the trees as burn-in as determined graphically using Tracer v1.5. Phylogenetic trees were visualized using FigTree v1.4.2 (see Figure 2).

Comparative analyses of ancestral annotations (geographical and ecological traits of aquatic Heteroptera) using parsimony (PhyloType) and Bayesian (BEAST) methods

The biogeographical character biomes (zones 1 to 5) were used to analyze the phylogeography of aquatic Heteroptera in Cameroon. Similarly, several ecological traits were analyzed in combination, thus forming what we will call next "primary annotations". These ecological traits are as follows: habitat characteristics: living on the aquatic vegetation (coded v), living near the bottom of the water column (coded f), living near or at the water surface (coded s), living near the river edge (coded r); feeding habits: macropredator that feeds on large preys or macropreys (fish, freshwater mollusc…) (coded M), micropredator that feeds on other aquatic insect larvae (coded m), phytozoophagous that (coded p) and scavenger/ detritivorous that eats weakened or dead prey (coded c); flying capacity: able to fly (coded 1) or not (coded 0); and finally, the characterization of *M. ulcerans* cells in that aquatic Heteroptera (coded a) or not (coded b). These primary annotations considered independently or in combination were used to infer ancestral traits reconstruction using the Beast and PhyloType programs and to perform comparative analyses of ancestral biogeographical and ecological traits of aquatic Heteroptera taxa.

Used independently, the ancestral annotations « zones 1 to 5», when set onto a rooted phylogenetic tree (see Figure 3) will produce a comparative analysis to determine (i) which Heteroptera lineages are associated with which type of biome, if any, and (ii) which biome(s) is the ancestral state versus which one(s) derived from. Then multiple two-ways, three-ways or nways annotations may be calculated between the different characters, e.g. zone4×living near the bottom of the water column (f)× feeding on larger preys (M)×Flying capacity (1) [or zone4×f×M×1; we simply used z4fM1 in Figures due to character space limitation in the different softwares used] and these different annotations represent the corresponding conditional events that may exist when sets onto the different phylogenetic trees of aquatic Heteroptera.

The PhyloType approach used parsimony methods which treated the annotations as nonordered discrete characters and a shuffling procedure to both perform two trees transversals associating each tree node with the set of most parsimonious annotations.

However, Beast used Bayesian inference to calculate and displaythe probability of all ancestral annotations presented at each node. The spatial information and combinations were considered as discrete characters and their ancestral states were reconstructed by fitting a standard continuous-time Markov chain (CTMC) model. We used a Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS) procedure [33] allowing transition rates to be zero with some probability in order to achieve statistical efficiency and identify significant epidemiological linkage among all possible migration pathways. For the "biomes" annotation, both a symmetric diffusion model and an asymmetric diffusion model were tested. The asymmetric diffusion model was identified as better fitting our data by using the Model comparison function (which compares models AIC scores) implemented in the Tracer v1.6 software. Only the symmetric diffusion model was used for the combination.

Analysis was conducted using a Bayesian Skyline tree prior and the prior location clock rate was set as default (CTMC Rate Reference) since we do not have adequate prior information [34]. For each reconstruction we ran two independent analyses of 50 million generations with

parameters sampled every 1000 generations. MCC were generated as previously described in the text and visualized using FigTree v1.4.2.

For each node of tree only the annotation having the highest probability was used for our analysis.

Searching for aquatic Heteroptera phylotypes according to their biogeographical and ecological traits and M. ulcerans presence

The phylotypes analyses require a rooted tree for studied Heteroptera taxa and primary annotations (biogeographical and ecological traits) which induced the common history of these taxa. These two components were combined in the Phylotype web to obtain the secondary annotations and Deltran option with 1000 iterations used to perform ancestral annotations parsimonious inference. The potential phylotypes were defined by the clades (subtrees) having a unique annotation at their root (common recent ancestor for phylotype members). We used some values of combinatorial and numerical criteria provided by the web interface like number of taxa (members) in the potential phylotypes (Sz = 3), Size/Difference ratio (Sz/Df = 1), persistence (Ps = 1), branches support (Sp ≥ 0.75) to measure the relevance of potential phylotypes (see SM2 for details).

Visualization and analysis of the dissemination pathways

SPREAD v1.0.6 software [35] was used to maps annotated phylogenies and to export high-dimensional posterior summaries to keyhole markup language (KML) for visualization of the spatial diffusion of aquatic Heteroptera taxa through time in Google Earth software. The MCC annotated tree calculated by Beast was used as input and longitude and latitude data for each biome were chosen and included in the analyses as geographical coordinates.

Bayes factor calculation implemented in SPREAD was used to identify well-supported migration links between the different biomes based on the Phylogeographic Bayesian stochastic search variable selection procedure (BSSVS) estimates implemented in Beast. Since we used an asymmetric model, we can infer directionality for a given route.

Results

Reconstruction of relationships between aquatic Heteroptera taxa using Beast (Bayesian inference) and PhyML (maximum likelihood) models

Data set of 171 COI sequences from aquatic Heteroptera taxa belonging to eleven families (Belostomatidae, Coixidae, Gerridae, Hebridae, Hydrometridae, Mesoveliidae, Micronectidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae, Veliidae) from two infra-orders (Nepomorpha and Gerromorpha) collected in Cameroon were used to reconstruct the ancestral relationships among these. In general, the two trees showed almost similar topology with a perfect grouping of taxa within the respective families, although significant differences were observed especially on the older nodes (see Figure 2). Gerromorpha are positioned at the root of Nepomorpha. Both Mesoveliidae and Hydrometridae families are appeared as common old ancestors of all taxa for Beast and for PhyML, only Hydrometridae family are appeared as common old ancestor of all taxa. In this last case, Mesoveliidae is being the immediate descendant of Hydrometridae. There is

one common ancestor for all Nepomorpha which forms monophyletic group in both cases unlike Gerromorpha which have 2 and 3 clusters with 2 and 3 different common ancestors respectively for Beast and PhyML, and therefore form a paraphyletic group. Within some families there are some differences in taxa grouping depending on the method used. The Beast tree shows 8 monophyletic families with branches supported over 75% against 7 families for PhyML with branches supported over 75% as well. The Naucoridae and Veliidae are paraphyletic in the two trees, one Naucoridae cluster shares the same ancestor with a cluster of Notonectidae (monophyletic for PhyML and paraphyletic for Beast) in both trees and the other cluster shares a common ancestor with Corixidae in the Beast tree while the same cluster appears as direct ancestor of Corixidae in PhyML tree. Belostomatidae and Nepidae have a common ancestor in the two trees but in the Beast tree, each of these families forms monophyletic group and in the PhyML tree, each of them is a paraphyletic group. In this latter case, the clusters of Nepidae are placed within clusters of Belostomatidae. One cluster of Veliidae shares a common origin with Hebridae in both trees and the other cluster appears just before and it is positioned at the root of the first cluster of Veliidae, Hebridae and Gerridae in the Beast tree while the same cluster is not the root of Gerridae in PhyML tree.

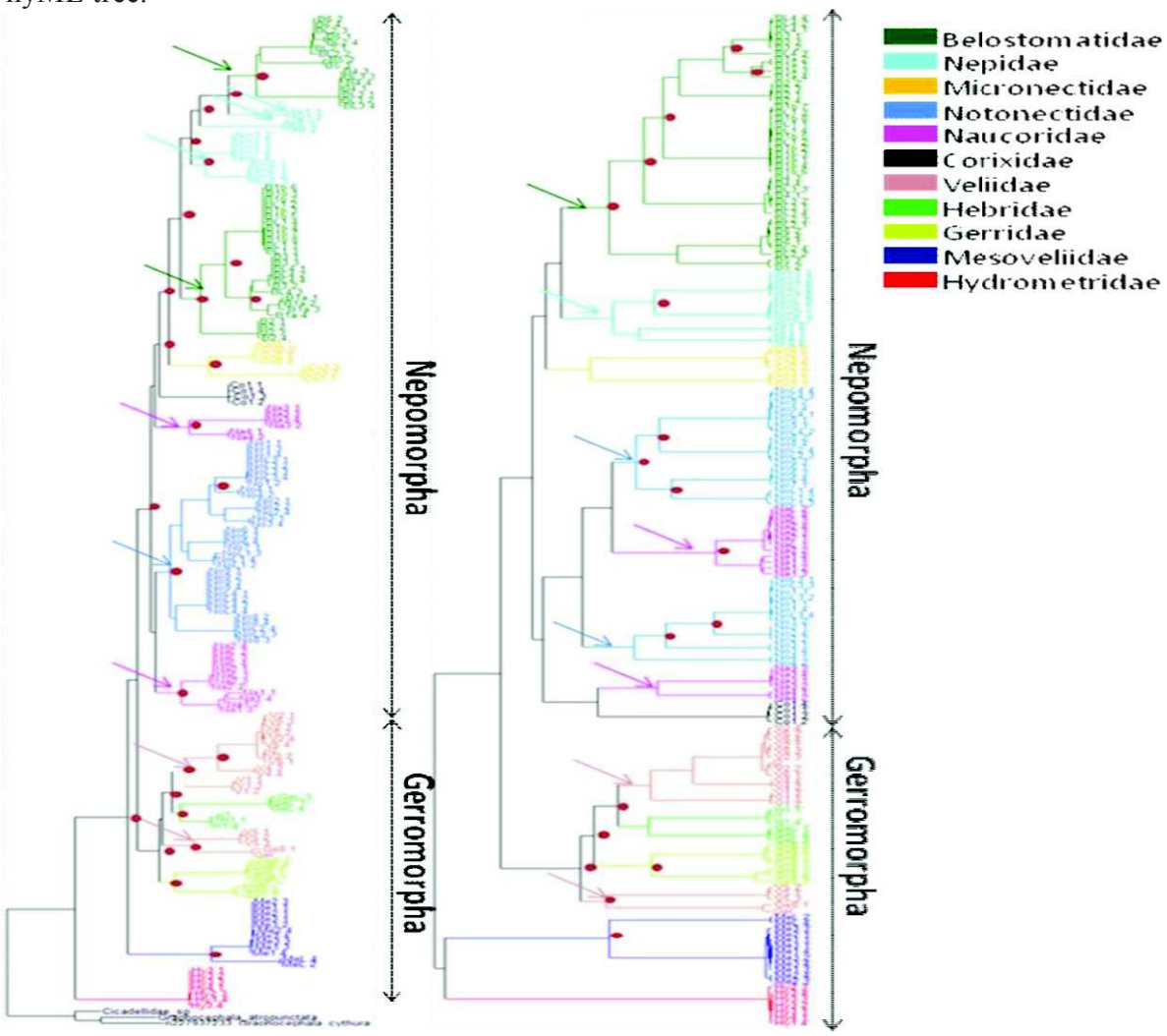


Figure 2: Setting facing phylogenetic trees based on the PhyML (left), and BEAST [36]. Trees were annotated according to taxonomic information (sub-trees color corresponding to families), the

branches support values ≥ 75% (red points). Correspondence between Heteroptera taxa groups for one tree to another is represented by the arrows with same color.

Aquatic Heteroptera of Cameroon: Phylogeography and comparative analysis of ancestral annotation using both Bayesian (Beast) and Parsimony (PhyloType) methods

The study of the distribution of ancestral annotation of aquatic Heteroptera according to biogeographic criteria is part of the concept of phylogeography which describes principles and processes that govern the distribution of animal or plant lineages, especially at intra-specific level [37]. The Bayesian and parsimony approaches used in this study allowed tracing the historical scenario of aquatic Heteroptera taxa spread using the "biomes" factor (agro-ecological zones) of Cameroon where they were collected. Overall, the distribution of ancestral annotations is almost identical in both approaches and the ancestral annotation (zone2) corresponding to the high Guinea savannah zone of Cameroon, appears to be the origin center of spread of these Heteropterans. This ancestral annotation persists in most of the internal nodes and even to the terminal taxa of some aquatic Heteroptera families (Figure 3). Taxa belonging to 11 families identified in this work are represented in the biome 2 (zone2) except Hebridae (see Table 1). The PhyloType analysis performs ancestral trait reconstruction using parsimony and detects relevant phylotypes (subsets of taxa with close phylogenetic relationships and common trait values) while Beast performs ancestral trait reconstruction using a probabilistic approach allowing to know the probability of each annotation at each nodes of the tree and therefore to have an estimation of the associated uncertainly. This explains that the final results could differ between the two methods and that the existence of certain annotations that are absent in one or the other approach. This is the case of the annotation zone1 which is present in Mesoveliidae taxa (80% probability), of zone3 present in Belostomatidae (90% probability) and Nepidae (80% probability) with Bayesian method, and which are absent using the parsimony method. Similarly the annotation zone2 present in Hydrometridae taxa for parsimony method was not retained for Bayesian method; in this case, the annotation "zone1" (68% probability) was retained at the expense of zone2 (only 29.5% probability) (see Figure 3).

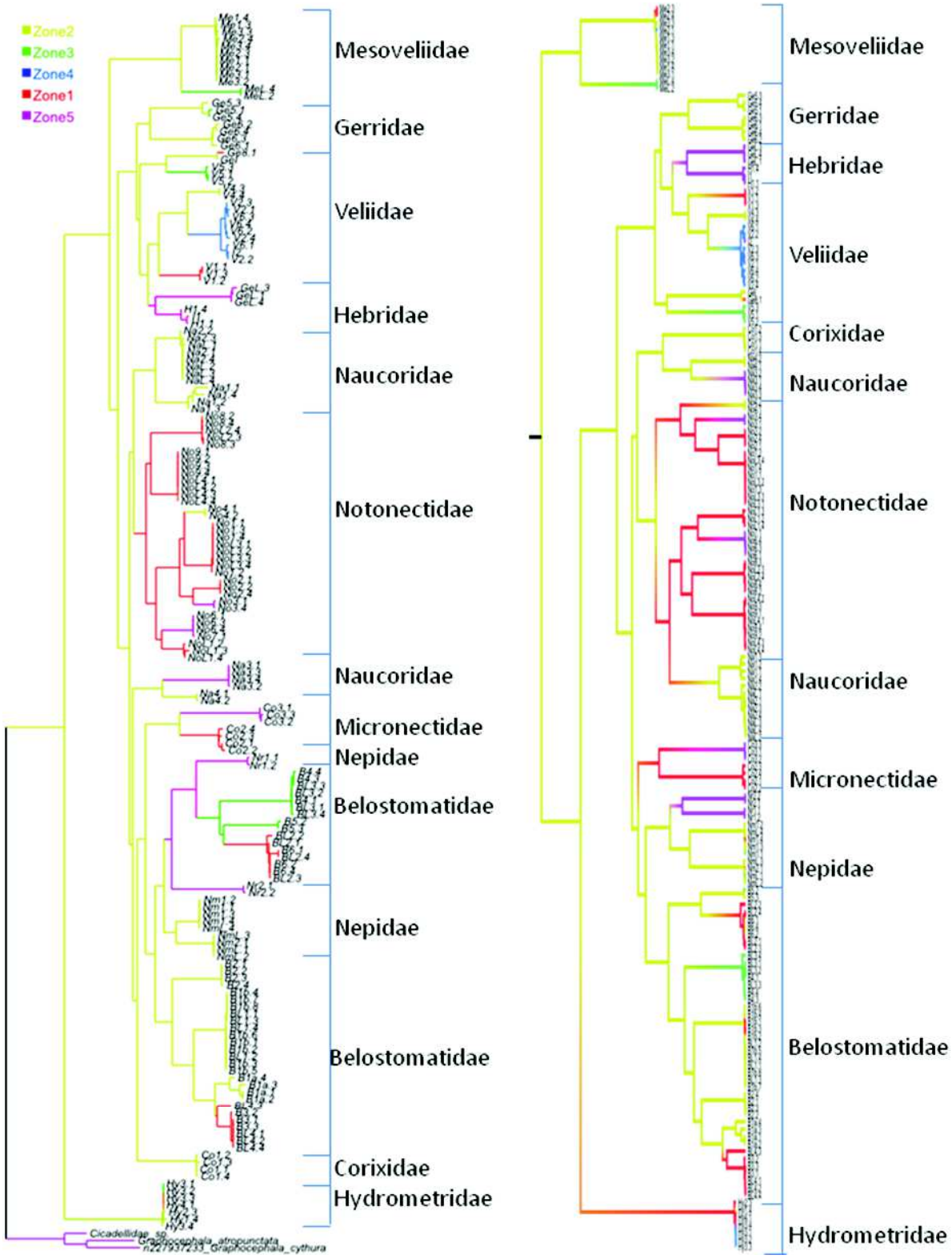


Figure 3 : Setting facing ancestral annotation biomes reconstructed with PhyloType (left) and Beast (right) [36]. Biomes (5 different zones) are illustrated with different colors on the phylogenies.

Table 1: Ancestral annotations for biomes and their presence (apparition) in aquatic Heteroptera taxa and related families

Families	Beast ancestral Annotations	Phylotype ancestral Annotations
Mesoveliidae	zone1, zone2, zone3	zone2, zone3
Gerridae	zone1, zone2	zone1, zone2
Veliidae	zone1, zone2, zone3, zone4	zone1, zone2, zone3, zone4
Hebridae	zone5	zone5
Naucoridae	zone2, zone5	zone2, zone5
Notonectidae	zone1, zone2, zone5	zone1, zone2, zone5
Micronectidae	zone2, zone5	zone2, zone5
Nepidae	zone2, zone3, zone5	zone2, zone5
Belostomatidae	zone1, zone2, zone3	zone1, zone2
Corixidae	zone2	zone2
Hydrometridae	zone1, zone4	zone1, zone2, zone4

Mapping of the dissemination pathways of aquatic Heteroptera inside biomes of Cameroon

The asymmetrical model used for this analysis considers different transition rates for each transition. For each transition a Bayesian Factors (BF) is calculated to determine whether this transition is significant or not. Following significant BF were observed between the different transition states: Zone2 to Zone3 (BF=146765.708), Zone4 to Zone5 (BF = 1394.538), Zone2 to Zone1 (BF = 908.346), Zone2 to Zone4 (BF = 15.397), Zone1 to Zone2 (BF = 14.643), Zone1 to Zone5 (BF = 10.872). Biomes zone2 was connected with all others biomes except biome zone5 which is connected with zone4 and zone1. There is a double sense transition between zone1 and zone2 (see Figure 4).

Study of aquatic Heteroptera phylotypes based on agro-ecological zones (biomes) of Cameroon

The analysis based on biomes allowed to obtain 4 phylotypes including 99 sequences (57 % of all the molecular data set). 72 other sequences (43%) not having satisfied PhyloType selection criteria were not taken into account. The phylotype zone2 is the origin from which emerge directly phylotypes zone1 and zone4; the phylotype zone3 noted in red color seems to emerge indirectly from zone2 (see Figure 5). Indeed, there has been a break between annotations zone2 and zone3 including Zone5 that appears on the legend and having the same number as the phylotype zone3 (node 219 on Figure 5) but there are no aquatic Heteroptera sequences associated at this ancestral annotation. This break is due to the presence of two ancestral annotations at this node (zone3 and zone5) and annotation zone3 was retained as shown in the phylotype map (see Figure 5B). These observations are confirmed by the Beast results showing the best value (86.3%) for the ancestral annotation zone3 compared to the ancestral annotation zone 5 (21.3%). Moreover, this node has the same topology in Beast and PhyloType ancestral annotations trees (see Figure 3). Figure 5C shows potential spread of aquatic Heteroptera in different biomes found in Cameroon. Phylotype zone2 consists to 56 sequences (89% coverage) (see SM2), and it includes taxa belonging to Corixidae, Belostomatidae, Nepidae, Naucoridae, Gerridae and Mesoveliidae families (see Figure 5A). The phylotype zone1 is formed by 27 sequences (47% coverage) of taxa belonging to Notonectidae family while the phylotype zone4 is represented by 47 sequences (47% coverage) of

taxa belonging to Veliidae family and zone3 formed by 8 sequences (53% coverage) of taxa belonging to Belostomatidae family (see Figure 5A and SM2).

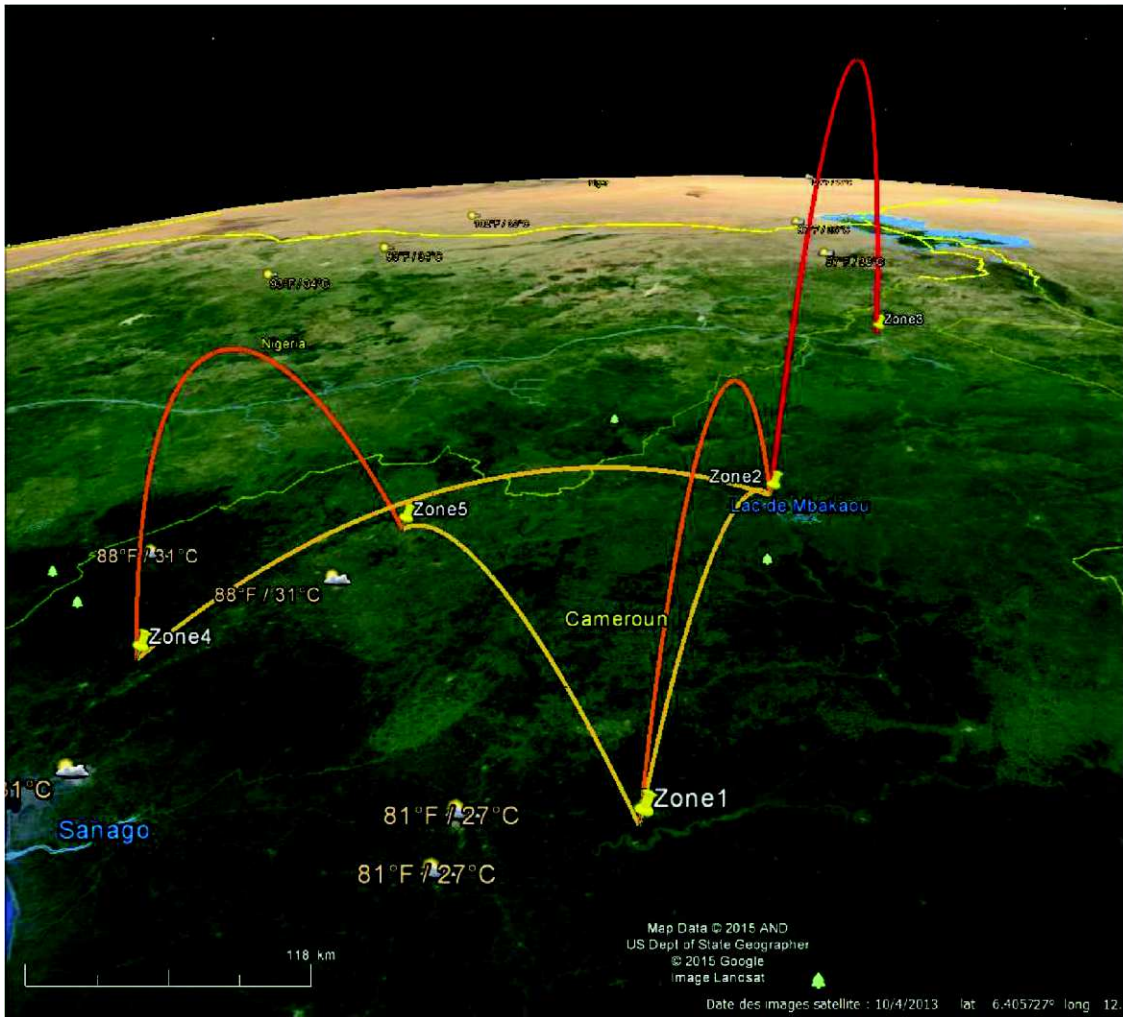


Figure 4: Aquatic bugs spread according to biomes of Cameroon

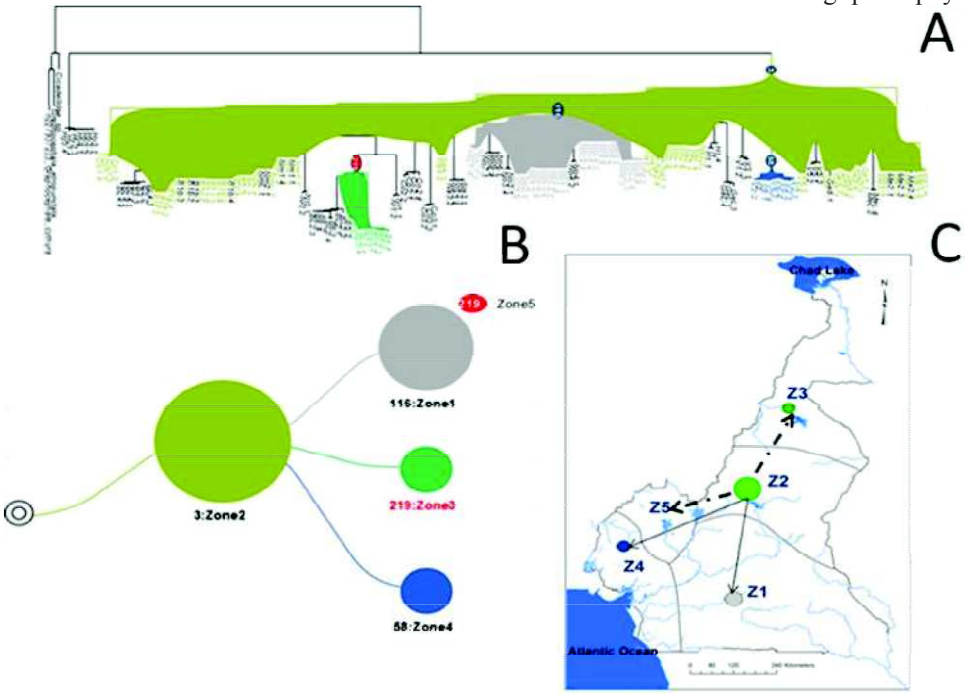


Fig. 5: Distribution of aquatic Heteroptera phylotypes through the major biomes of Cameroon using the PhyloType approach.

Legend: (A) Phylotypes distribution tree showing aquatic Heteroptera taxa involved; (B) phylotype distribution flow chart; (C) geographical distribution of phylotypes on the map of Cameroon. (Z1 - Z5) = major biomes of Cameroon, the arrows show the origin of phylotypes from Z2: full line = direct emergence, dashed = indirect emergence.

Analyze of aquatic Heteroptera ecological traits and search of Mycobacterium ulcerans signal using Beast (Bayesian) and phylotype (Parsimony) methods

The analysis of the combination of aquatic Heteroptera ecological traits using Parsimony and Bayesian inference methods allowed obtaining respectively 20 and 30 combinations of ancestral annotations. Globally, these ancestral annotations are distributed in the same way in the phylogenetic trees calculated with both methods. This high number of ancestral annotations combinations makes the visualization and interpretation difficult. For this reason, we then selected only clusters showing the M. ulcerans signal. The presence of M. ulcerans signal (illustrated by the latter "a" in combination) initially absent in ancestral annotations appear in the lineages of some aquatic Heteroptera families and persists until the terminal taxa. Whichever approach (Beast or PhyloType), the M. ulcerans signal is detected in 5 following combinations of ancestral annotations: z1×v×1×M×a, z2×v×1×M×a, z3×v×1×M×a, z2×v×0×M×a and z5×v×0×M×a (see Figures 6-7). These combinations include only taxa belonging to Naucoridae and Belostomatidae families (see Figures 6-7). All biomes are represented in these combinations except z4, the type of habitat present here is living on aquatic vegetation (v) and the retaining finding habit is macropredator (M) (see Figures 6-7). We can note the presence of the flying capacity [38] or not in these combinations of ancestral annotations. According to these results, the presence of M. ulcerans signal in an ancestral annotation is closely associated with certain aquatic Heteroptera ecological traits such as the type of habitats (living on aquatic vegetation) and feeding habits (being preferentially a macropredator).

Furthermore so that the M. ulcerans signal is present in an ancestral annotation of aquatic Heteroptera taxa, it is necessary that the bacillus may contaminate aquatic Heteroptera specimens in an aquatic environment containing itself the mycobacterium. Therefore biomes z1, z2, z3 and z5 present in these ancestral annotations combinations would harbour *M. ulcerans* in their aquatic environment. On the contrary, our analysis shows that biome Zone4, i.e. humid forest with monomodal rainfall, would nor harbour or favorize the persistence of M. ulcerans in this type of aquatic environment. In contrast, aquatic Heteroptera flying capacity seems not to influence indirectly the presence of *M. ulcerans* signal in ancestral annotations. However, aquatic Heteroptera taxa able of flying would potentially facilitate the dissemination of the mycobacterium in the environment by contaminating new free environments during their colonization.

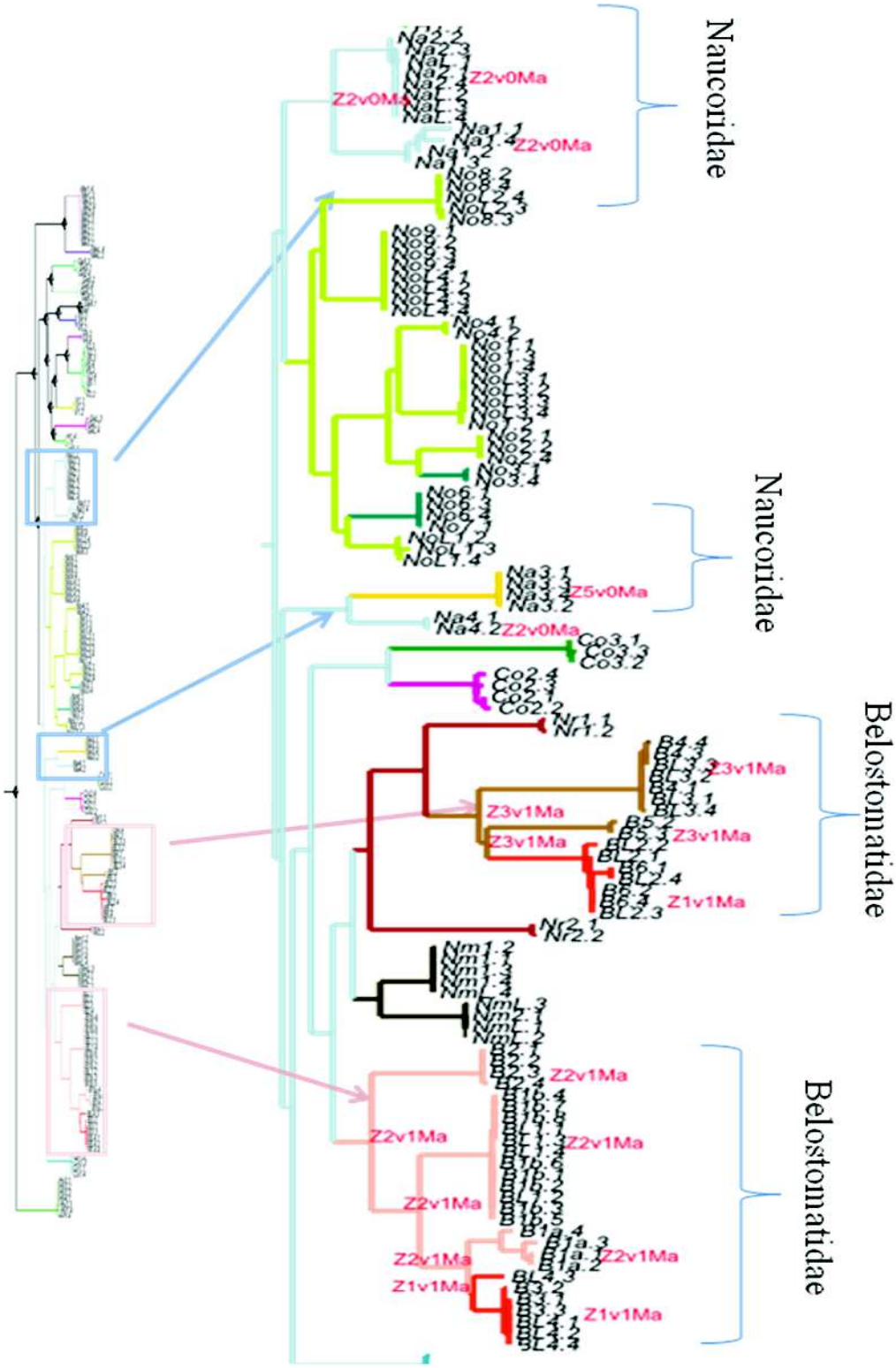


Figure 6 : Zoom on clades of ancestral annotations with the *M. ulcerans* signal (Parsimony)

("Z1 to 5" are the corresponding agro-ecological zones of Cameroon, "v" is type of habitat: living on aquatic vegetation "1" corresponds to flying capacity versus "0" no flying capacity "M" is

macropredator and “a” is vector potential) is that the Heteropteran taxon has been identified to host *Mycobacterium ulcerans.*

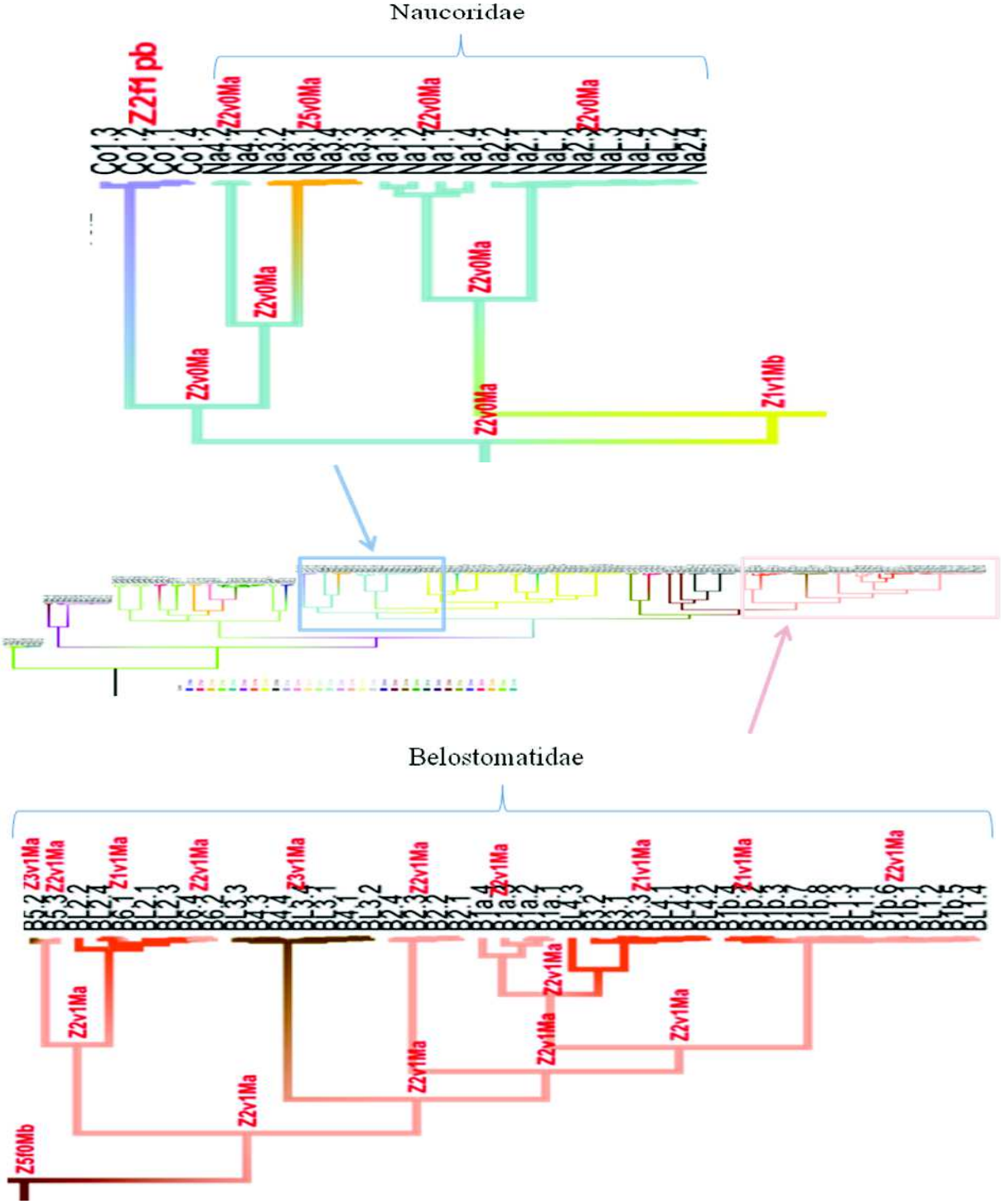


Figure 7 : Zoom on clades of ancestrale annotations with the *M. ulcerans* signal (Bayesian inference) (“Z1 to 5” are the corresponding agro-ecological zones of Cameroon, “v” is type of habitat: living on aquatic vegetation “1” corresponds to flying capacity versus “0” no flying capacity “M” is macropredator and “a” is vector potential) is that the Heteropteran taxon has been identified to host *Mycobacterium ulcerans*.

Searching of aquatic Heteroptera phylotypes based on combinations of their ecological traits and M. ulcerans signal

Aquatic Heteroptera ecological traits used in this study (biome, type of habitat, feeding habits, flight capacity or not, and potential host carrier or not) are combined and analyzed by the parsimony method to get 20 phylotypes associated to 19 ancestral annotation combinations including 135 sequences (77,6% of all molecular data set) (see SM3). Six phylotypes (91, 187, 270, 219, 312 and 237) represented by the following ancestral annotation combinations z1v1Ma, z2v1Ma, z3v1Ma, z2v0Ma and z5v0Ma contain the *M. ulcerans* signal (phylotypes containing the red point in Figure 8B). The phylotype 91 consists of 14 sequences (100% coverage) of taxa belonging to the Naucoridae family (Figure 8A that live on aquatic vegetation, which does not have a flying capacity, feed on macro-prey and they were collected in the biome zone2). From this phylotype emerge other phylotypes including 5 which contain the M. ulcerans signal (see Figure 8B). The phylotype 187 consists of 4 sequences (100% coverage) of taxa also belonging to the Naucoridae family which were collected in the biome zone5. The phylotypes 270, 219, 237 and 312 consist respectively to 16, 4, 4 and 6 sequences (with respective coverage: 80%, 100%, 27% and 40%) of taxa belonging to the Belostomatidae family which are able to fly, live on aquatic vegetation, feed on macro-prey and were collected respectively in the biomes zone1, zone2, and zone3. There have been break to 219 annotation node due to the presence of two phylotypes annotated differently (z3v1Ma and z5f0Mb). In addition, the branches support value at this node is very low (0.75) relative to the other branches support we obtained.

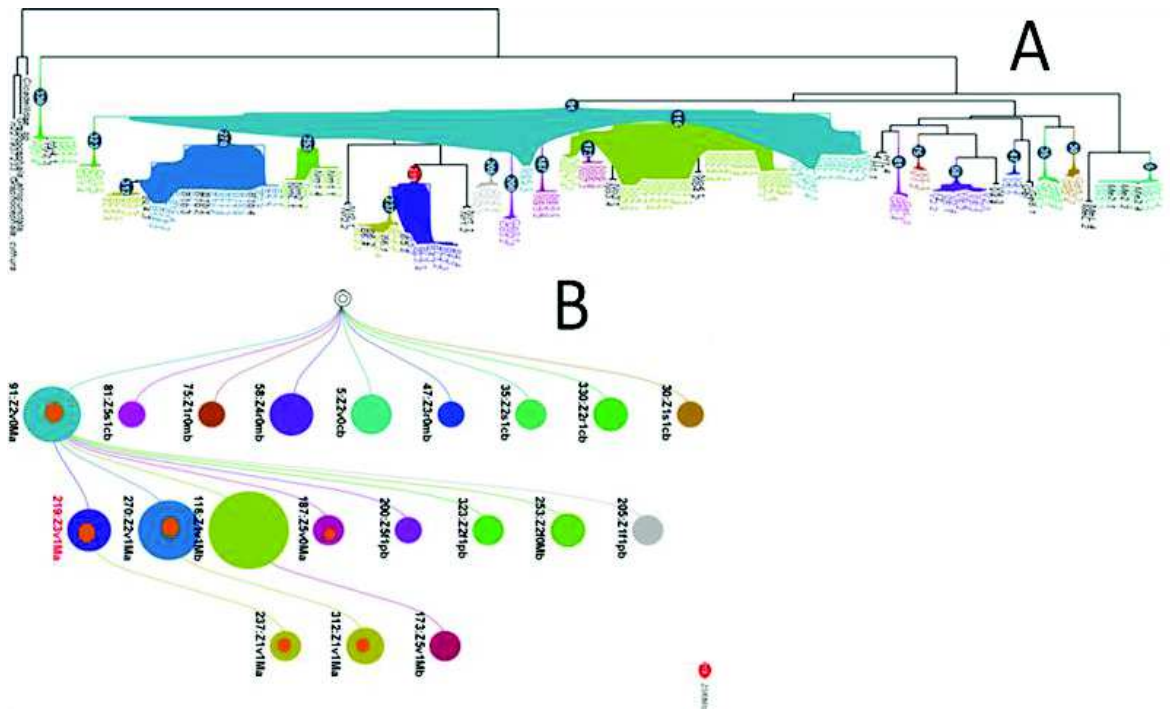


Fig. 8: Aquatic Heteroptera phylotypes based on their biogeographical and ecological traits combinations and search of *M. ulcerans* signal. **(A)** Phylotypes distribution tree showing aquatic bug taxa involved**; (B)** phylotype flow chart diagram; phylotypes with red points contain the *M. ulcerans* signal.

Legend: Biomes (z1=zone1, z2=zone2, z3=zone3, z4=zone4, z5=zone5); type habitat: living on (f= bottom of water column, r= river edge, v=aquatic vegetation, s=water surface), feeding habit (M=macropredator, m=micropredator, p= phytozoophagous, c=detrivorous), fligh capacity=1 or not=0, potential vector=1 or not=0

Discussion

The comparative analysis using Maximum Likelihood (PhyML) and Bayesian (Beast) from 171 sequences of COI shows the ancestral relationships among taxa of aquatic Heteroptera collected in different biomes of Cameroon, central Africa. Higher taxa (sub-orders and families) are distinguishable on both phylogenetic trees and sequences (taxa) are globally grouping within the respective families. All Nepomorpha included in this study have a common ancestor and form monophyletic group in both cases unlike Gerromorpha which have 2 and 3 clusters with 2 and 3 different common ancestors respectively for Beast and PhyML, and therefore form a paraphyletic group. In additional, Gerromorpha are positioned at the root of Nepomorpha on both phylogenetic trees. Despite the fact thatthe phylogenetic relationships remain highly discussed among Heteroptera particularly aquatic Heteroptera, our results corroborate with the revised scheme of the evolutionary history of Heteroptera presented by [39]. This author describes Gerromorpha as a group at the bases of the lineages leading to other major taxa of modern Heteroptera and advocates the hypothesis of the Gerromorpha as a strongly paraphyletic group according to [40]. Although the taxa are grouped in the respective families, significant differences observed here are due on the one hand to the robustness of the trees calculation method and secondly to the molecular marker used. Our study is performed on a portion of mitochondrial gene that seems not enough (COI) for phylogenetic analysis of aquatic Heteroptera. The robust phylogenetic study needs several nuclear and mitochondrial genes for example, [6] were used COI and a nuclear gene encoded elongate factor 1 alpha (EF-1α) to study the phylogeny of genus Gerris (Gerridae family).

Regardless of the Beast or PhyloType approach, phylogeography of aquatic bugs of Cameroon is mainly represented by the ancestral annotation zone2 that appears to be the origin center of aquatic Heteroptera spread in Cameroon. Despite the position of zone2 to root of ancestral annotations for higher taxa of aquatic bugs, (infra-orders and families), we have noted a wide geographical distribution at lower taxonomic levels. This is the case of taxa belonging to Veliidae, Notonectidae, Belostomatidae, Nepidae, Hydrometridae, Mesoveliidae and Micronectidae families which were present in three biomes on a total of five unlike the taxa of Corixidae and Hebridae families which were present in only in one biome respectively Zone2 and Zone5 (see Figure 2, Table1). This geographical distribution of ancestral annotations of lower taxa of aquatic Heteroptera was illustrated by the phylotypes 58, 116 and 219 corresponding to ancestral annotations zone1, zone3 and zone4 respectively emerging from phylotype 3 corresponding to ancestral annotation zone2; note however that phylotype 219 colored in red has indirect origin from this (see Figure 5). According to [22], the 219 node was annotated differently by zone3 and zone5 but zone3 was retained by the shuffling using Deltran parsimony algorithm with 1000 iterations and P-v $\geq$ 0.05 and zone5 was displayed in the legend with the same phylotype number 219. Indeed, the hydrographic network of Cameroon form a more or less communicating network whose starting point is the Zone2 containing the Adamawa region, which is the water tower that supplies the rivers of Cameroon thus facilitating the movement of aquatic animals including aquatic Heteroptera through these corridors between the different biomes. The starting point (zone2) appears as the origin center of spread of aquatic Heteroptera in Cameroon.

These observations agree with the map obtained with Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamic (SPREAD) showing higher number of connections between zone2 and all the other biomes.

In the case of the combination of environmental and geographic traits of aquatic Heteroptera, both trees obtained show overall a similar topology of the distribution of ancestral annotation combinations. Five ancestral annotation combinations including taxa belonging to the Naucoridae and Belostomatidae families have the *M. ulcerans* signal. The same combinations of ancestral annotations are found in phylotypes having the *M. ulcerans* signal and also consisting of taxa belonging to the Belostomatidae and Naucoridae families (see Figure 8). Belostomatidae and Naucoridae families have their preferred habitat on aquatic vegetation and they also share the same feeding habits as macropredators. These two ecological traits seem to facilitate the contact between aquatic Heteroptera and *M. ulcerans*, an ubiquitous mycobacterium that inhabits aquatic biotopes in tropical regions and exists on aquatic plants where it can develop biofilms [15]. It growths and persists in environment having particular features like low oxygen and moderated pH conditions [41,42]. These particular environmental conditions seem to exist in biomes Zone1, Zone2, Zone3 and Zone5 that are present in the ancestral annotations combinations having the *M. ulcerans* signal (z1v1Ma, z2v1Ma, z3v1Ma, z2v0Ma and z5v0Ma) and absent in the biome zone4 corresponding to humid forest with monomodal rainfall that does not exist in these combinations. Flying capacity does not seem to be directly involved in the contact between aquatic Heteroptera and *M. ulcerans* but it would nevertheless facilitate the spread of this mycobacterium spatially by contaminating free-microbe environments.

Conclusion

In conclusion, our findings tend to indicate that both several biogeographical conditions favourizing the persistence of environmentally-free bacilli associated with some specific ecological traits in a couple of specific aquatic bug taxa, i.e. Belostomatidae and Naucoridae, might contribute to the acquisition of the bacillus from the aquatic environment by those arthropods. These aquatic bugs might then circumstantially and locally contribute to the disease agent transmission in human as host carriers better than true vectors.

Reference

1. Polhemus JT, Polhemus DA (2007) Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. . Hydrobiologia 595: 379 - 391.

2. Schuh RT (1979) Review of evolutionary trends in Heteroptera. part II. Mouthparts-structures and feeding strategies, by R.H. Cobben. Syst Zool 28: 653-656.

3. Andersen NM (1982) The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. Entomonograph 3: 1-455.

4. Andersen NM, Weir TA (2004) Australien Water bugs their biology and identification (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha & Nepomorpha). Entomograph 14: 1-396.

5. Chen P-p, Nieser N, Zettel H (2005) The aquatic and semi-aquatic bugs (Heteroptera: Nepomorpha and Gerromorpha) of Malesia. Fauna Malesiana Handbook 5: 1 - 546.

6. Damgaard Ja, perling FAHS (2001) Phylogeny of the water strider genus Gerris Fabricius (Heteroptera: Gerridae) based on COI mtDNA, EF-1α nuclear DNA and morphology. Systematic Entomology 26: 241-254.

7. Damgaard J, Moreirab FFF, Hayashic M, Weird TA, Zettele H (2012) Molecular phylogeny of the pond treaders (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Mesoveliidae), discussion of the fossil record and a checklist of species assigned to the family. Insect Systematics & Evolution 43: 175-212.

8. Damgaard J (2006) Systematics, Historical Biogeography and Ecological Phylogenetics in a clade of water striders1. zugleich Kataloge der OÖ Landesmuseen 19: 813-822.

9. Poisson R (1929) Contribution à la faune du Cameroun Hémiptères aquatiques. Faune Colon Fr 3: 135–164.

10. Poisson R (1937) Voyage de M. P.-P. Grassé en Afrique Occidentale Francaise. Hemiptera aquatica. Ann Soc Entomol Fr 106: 115–132.

11. Poisson R (1940a) Contribution à l'étude des Gerris africains (Hémiptères Gerridae) : sur la synonymie de G. swakopensis (Stâl) et G. diversa (Mayr) et description d'une nouvelle espèce. Extrait du Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne 17. : 1-19.

12. Poisson R (1941b) Hemiptères aquatiques du Cameroun (Mission Lepesme, Paulian et Villiers, 1939). Bulletin de la Société Entomologique de France: 4.

13. Poisson R (1945) Quelques Hémiptères aquatiques africains et malgaches par Raymond Poisson. Bulletin de la Société Entomologique de France: 7.

14. Poisson R (1948a) Hydrocorises du Cameroun. Mission J. Carayon 1947. Rev Fr Entomol 3: 167–177.

15. Marsollier L, Robert R, Aubry J, André J-PS, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic Insects as a Vector for Mycobacterium ulcerans Applied and Environmental Microbiology 68: 46234628.

16. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne P-A, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection The Lancet 353: 986.

17. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, et al. (2010) Seasonal and Regional Dynamics of M. ulcerans Transmission in Environmental Context: Deciphering the Role of Water Bugs as Hosts and Vectors. PLoS Negleted Tropical Deseases 4: 1-10.

18. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, et al. (2011) Geographic Expansion of Buruli Ulcer Disease, Cameroon. Emerg Infect Dis 17: 551–553.

19. Ebong SMA, Eyangoh S, Marion E, Landier J, Marsollier L, et al. (2012) Survey of water bugs in Bankim, a new Buruli ulcer endemic area in Cameroon. . Journal of Tropical Medicine: 1-8.

20. Drummond AJ, Xie W, Heled J (2012) Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data using BEAST. User manual: 1-18.

21. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, et al. (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. SYSTEMATIC BIOLOGY 59: 307-321.

22. Chevenet F, Jung M, Peeters M, Oliveira Td, Gascuel O (2013) Searching for virus phylotypes. Bioinformatics 29: 561-570.

23. IRAD (2008) Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Rapport national: 1-83.

24. Macherey-Nagel® (2012) NucleoSpin, Tissue Genomic DNA from tissue. User manual: 1-50.

25. Folmer O, Black M, Hoeh. W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 3: 294-299.

26. Affymetrix® (2012) USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup. User manual: 1-4.

27. GenBank® (2013) The NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences.

28. Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol Biol Evol 25: 1253–1256.

29. Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Syst Biol 55: 539-552.

30. Chevenet F, Brun C, Bañuls A-L, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC Bioinformatics 7: 1-9.

31. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol Biol Evol 29: 1969-1973.

32. Swofford DL, Maddison WP (1987) Reconstructing Ancestral Character States Under Wagner Parsimony. Mathematical Biosciences 87: 199-229.

33. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA (2009) Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. PLOS Computational Biology 5: 1-16.

34. Ferreira MAR, Suchard MA (2008) Bayesian analysis of elapsed times in continuous-time Markov chains. Canadian Journal of Statistics 36: 355-368.

35. Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA, Lemey aP (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. Bioinformatics Applications Note 27: 29102912.

36. Plowright Raina K. SSH, Gorman Michael E., Daszak Peter, and Foley Janet E. (2008) Causal inference in disease ecology: investigating ecological drivers of disease emergence. Front Ecol Environ 6: 420 - 429.

37. Kidd DM, Ritchie MG (2006) Phylogeographic information systems: putting the geography into phylogeography. Journal of Biogeography 33: 1851-1865.

38. Newton MAaAER, . J 1994: p. 3-48. (1994) Approximate Bayesian inference with the weighted likelihood bootstrap. Journal of the Royal Statistical Society 3-48.

39. Cobben RH (1978) Evolutionary trends in Heteroptera. part II. Mouthpart-structures and feeding strategies. Meded LandbHoogesch Wageningen 78: 1-407.

40. Ashlock PD (1974) the uses of cladistics. A rev Ecol Syst+ 5: 81-99.

41. Portaels F, Pattyn SR (1982) Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. Ann Microbiol (Paris) 133: 213-221.

42. Palomino JC, Obiang AM, Realini L, Meyers WM, Portaels F (1998) Effect of Oxygen on Growth of Mycobacterium ulcerans in the BACTEC System. JOURNAL OF CLINICAL Microbiology 36: 3420-3422.

Supplementary material

Supplementary material 1: The evolution model of nucleotide sequences was performed using LModelTest. The likelihood scores was calculated with PhyML for 88 candidate models and number of substation schemes equal to 11. Akaike's test allowed to select the best model (GTR+I+G) with following settings: Partition = 012345, negative log likelihood (-InL) = 12489.6675, number of estimated parameters (K) = 356, P-inv = 0.0000, Gamma shape = 0.2310

Model	-lnL	K	AIC	delta	weight	cumWeight
GTR+I+G	12489.6675	356	25691.3350	0.0000	0.9980	0.9980
TIM2+G	12498.9496	353	25703.8992	12.5642	0.0019	0.9998
GTR+G	12499.4473	355	5708.8946	17.5596	0.0002	1.0000
TIM2+I+G	12507.2601	354	25722.5203	31.1853	1.69e-007	1.0000
TIM1+I+G	12524.1754	354	25756.3508	65.0158	7.61e-015	1.0000
TIM3+I+G	12525.0392	354	25758.0784	66.7434	3.21e-015	1.0000
TPM3uf+I+G	12526.8146	353	25759.6292	68.2942	1.48e-015	1.0000
TIM1+G	12533.4628	353	25772.9256	81.5906	1.91e-018	1.0000
TIM3+G	12535.0651	353	25776.1302	4.7952	3.86e-019	1.0000
TrN+G	12537.8716	352	25779.7432	88.4082	6.33e-020	1.0000
HKY+I+G	12538.4296	352	25780.8592	89.5243	3.62e-020	1.0000
TPM1uf+G	12540.9062	352	25785.8124	94.4774	3.05e-021	1.0000
TVM+G	12540.9696	354	25789.9391	98.6041	3.87e-022	1.0000
TPM3uf+G	12544.7908	352	25793.5815	102.2465	6.26e-023	1.0000
HKY+G	12547.9575	351	25797.9151	106.5801	7.17e-024	1.0000
TPM2uf+G	12548.2338	352	25800.4675	109.1326	2.00e-024	1.0000
TPM2uf+G	12548.2338	352	25800.4675	109.1326	2.00e-024	1.0000
TVM+I+G	12549.0623	355	25808.1245	116.7895	4.35e-026	1.0000
TPM2uf+I+G	12553.0925	353	25812.1851	120.8501	5.71e-027	1.0000
TrN+I+G	12605.9176	353	25917.8352	226.5002	6.53e-050	1.0000
SYM+G	12700.4739	352	26104.9477	413.6127	1.53e-090	1.0000
SYM+I+G	12700.4854	353	26106.9709	415.6359	5.56e-091	1.0000
TIM2ef+G	12795.6447	350	26291.2895	99.9545	5.26e-131	1.0000
TIM2ef+I+G	12796.1511	351	26294.3022	602.9672	1.17e-131	1.0000
TIM1ef+G	12808.5386	350	26317.0772	625.7422	1.32e-136	1.0000
TIM1ef+I+G	12808.5542	351	26319.1084	627.7734	4.78e-137	1.0000
TVMef+G	12868.4969	351	26438.9938	747.6588	4.44e-163	1.0000
TVMef+I+G	12868.7649	352	26441.5297	750.1948	1.25e-163	1.0000
TIM3ef+I+G	12869.8183	351	26441.6366	750.3016	1.18e-163	1.0000
TIM3ef+G	12880.0536	350	26460.1073	768.7723	1.15e-167	1.0000
TrNef+G	12935.9111	349	26569.8222	878.4872	1.73e-191	1.0000
TrNef+I+G	12941.1454	350	26582.2908	890.9558	3.39e-194	1.0000
TPM2+G	12959.3548	349	26616.7097	925.3747	1.14e-201	1.0000
TPM1+I+G	12969.2128	350	26638.4256	947.0906	2.19e-206	1.0000
TPM1+I+G	12969.2128	350	26638.4256	947.0906	2.19e-206	1.0000
TPM2+I+G	13045.8685	350	26791.7371	1100.4021	0.00e+000	1.0000
TPM3+G	13063.1307	349	26824.2615	1132.9265	0.00e+000	1.0000
TPM3+I+G	13063.1491	350	26826.2982	1134.9632	0.00e+000	1.0000
F81+G	13077.8350	350	26855.6700	1164.3350	0.00e+000	1.0000
F81+I+G	13083.2685	351	26868.5369	1177.2020	0.00e+000	1.0000
K80+G	13106.9521	348	26909.9043	1218.5693	0.00e+000	1.0000
K80+I+G	13106.6697	349	26911.3394	1220.0044	0.00e+000	1.0000
JC+G	13404.7270	347	27503.4541	1812.1191	0.00e+000	1.0000

JC+I+G	13404.6625	348	27505.3249	1813.9900	0.00e+000	1.0000
GTR+I	13620.1425	355	27950.2849	2258.9499	0.00e+000	1.0000
TVM+I	13636.5455	354	27981.0910	2289.7560	0.00e+000	1.0000
TIM2+I	13639.9708	353	27985.9417	2294.6067	0.00e+000	1.0000
TPM2uf+I	13668.4728	352	28040.9456	2349.6106	0.00e+000	1.0000
SYM+I	13711.1531	352	28126.3062	2434.9713	0.00e+000	1.0000
TIM1+I	13788.6476	353	28283.2951	2591.9602	0.00e+000	1.0000
TPM3uf+I	13827.3718	352	28358.7436	2667.4086	0.00e+000	1.0000
TIM3+I	13832.0367	353	28370.0734	2678.7384	0.00e+000	1.0000
HKY+I	13843.9831	351	28389.9662	2698.6312	0.00e+000	1.0000
TrN+I	13850.7329	352	28405.4658	2714.1308	0.00e+000	1.0000
TVMef+I	13858.9500	351	28419.9000	2728.5651	0.00e+000	1.0000
TVMef+I	13858.9500	351	28419.9000	2728.5651	0.00e+000	1.0000
TPM1uf+I	13900.2186	352	28504.4372	2813.1022	0.00e+000	1.0000
TIM1ef+I	13930.5657	350	28561.1313	2869.7964	0.00e+000	1.0000
TPM2+I	13952.9653	349	28603.9306	2912.5956	0.00e+000	1.0000
TIM3ef+I	14006.1124	350	28712.2248	3020.8898	0.00e+000	1.0000
TrNef+I	14062.4255	349	28822.8510	3131.5160	0.00e+000	1.0000
TPM3+I	14156.9348	349	29011.8697	3320.5347	0.00e+000	1.0000
TPM1+I	14170.5230	349	29039.0460	3347.7110	0.00e+000	1.0000
K80+I	14207.6763	348	29111.3527	3420.0177	0.00e+000	1.0000
F81+I	14224.1525	350	29148.3049	3456.9699	0.00e+000	1.0000
TVM	14238.2207	353	29182.4413	3491.1063	0.00e+000	1.0000
GTR	14237.5160	354	29183.0321	3491.6971	0.00e+000	1.0000
TIM2	14276.9116	352	29257.8232	3566.4882	0.00e+000	1.0000
TPM2uf	14285.6232	351	29273.2465	3581.9115	0.00e+000	1.0000
SYM	14372.8177	351	29447.6354	3756.3004	0.00e+000	1.0000
TIM2ef	14455.0573	349	29608.1146	3916.7796	0.00e+000	1.0000
TVMef	14464.5504	350	29629.1008	3937.7658	0.00e+000	1.0000
JC+I	14484.4203	347	29662.8406	3971.5056	0.00e+000	1.0000
TPM1uf	14489.8952	351	29681.7904	3990.4555	0.00e+000	1.0000
TIM1	14490.7989	352	29685.5978	3994.2628	0.00e+000	1.0000
TPM2	14546.9047	348	29789.8094	4098.4744	0.00e+000	1.0000
TPM3uf	14548.9356	351	29799.8713	4108.5363	0.00e+000	1.0000
TIM3	14565.2792	352	29834.5584	4143.2235	0.00e+000	1.0000
HKY	14572.2296	350	29844.4592	4153.1243	0.00e+000	1.0000
TrN	14592.5644	351	29887.1287	4195.7937	0.00e+000	1.0000
TIM3ef	14720.8329	349	30139.6658	4448.3308	0.00e+000	1.0000
TIM3ef	14720.8329	349	30139.6658	4448.3308	0.00e+000	1.0000
TPM1	14757.4781	348	30210.9561	4519.6211	0.00e+000	1.0000
TPM3	14824.9338	348	30345.8677	4654.5327	0.00e+000	1.0000
TPM3	14824.9338	348	30345.8677	4654.5327	0.00e+000	1.0000
F81	14878.8643	349	30455.7285	4764.3935	0.00e+000	1.0000
K80	14890.2861	347	30474.5722	4783.2372	0.00e+000	1.0000
JC	15153.5273	346	30999.0547	5307.7197	0.00e+000	1.0000

Supplementary material 2: Statistical table of phylotype analysis biomes of Cameroon

Total of 4 phylotype(s) related to 4 annotation(s) involving 99 strains (57 %) Shuffling: 1000 iterations; Sz p-value threshold: 50/1000

ID	Anc	annot	Cov	sz	ps	sz/df	tt	df	sl	sg	dv	sl/dv	sg/dv	sp
3	root	zone2	89	56	1	2,435	164	23	0,113	0,113	0,255	0,443	0,443	0,8
				0/1000	1000/1000	921/1000								
116	3	zone1	47	27	2	9.0	35	3	0,031	0,076	0,132	0,238	0,58	0,89
				16/1000	649/1000	454/1000								
219	3	zone3	53	8	1	4	16	2	0,059	0,175	0,181	0,327	0,97	0,75
				0/1000	71/1000	9/1000								
58	3	zone4	47	8	2	8	9	1	0,084	0,193	0,018	4,56	10,492	0,98
				9/0/1000	8/1000	9/1000								

Supplementary material 3: statistical table of phylotype analysis on aquatic Heteroptera life traits combinations

Total of 20 phylotype(s) related to 19 annotation(s) involving 135 strains (77.6 %) Shuffling: 1000 iterations; Sz p-value treshold: all/1000

ID	Anc	annot	Cov	sz	ps	sz/df	tt	df	sl	sg	dv	sl/dv	sg/dv	sp
205	91	z1f1pb	100.0	4	1	inf	4	0	0.098	0.154	0.011	9.087	14.253	0.95
				0/1000	1/1000	1/1000								
75	root	z1romb	100.0	3	1	inf	3	0	0.103	0.12	0.004	27.567	32.053	0.99
				0/1000	0/1000	0/1000								
30	root	z1s1cb	75.0	3	1	inf	3	0	0.131	0.153	0.019	6.872	7.987	1
				0/1000	0/1000	0/1000								
312	270	z1v1Ma	40.0	6	1	inf	6	0	0.035	0.105	0.005	6.912	20.937	0.98
				0/1000	72/1000	72/1000								
237	219	z1v1Ma	27.0	4	1	2.0	7	2	0.109	0.193	0.014	7.984	14.132	1
				16/1000	72/1000	25/1000								
116	91	z1v1Mb	100.0	27	2	9.0	35	3	0.031	0.076	0.132	0.238	0.58	0.89
				0/1000	50/1000	54/1000								
253	91	z2f0Mb	100.0	5	2	1.25	9	4	0.031	0.056	0.074	0.413	0.763	0.84
				0/1000	0/1000	0/1000								
323	91	z2f1pb	100.0	4	1	inf	4	0	0.148	0.154	0.005	32.802	34.001	1
				0/1000	0/1000	0/1000								
330	root	z2r1cb	100.0	5	1	2.5	7	2	0.246	0.246	0.004	61.517	61.517	0.99
				0/1000	3/1000	0/1000								
35	root	z2s1cb	80.0	4	1	inf	4	0	0.155	0.184	0.012	13.248	15.671	1
				0/1000	2/1000	2/1000								
5	root	z2v0cb	100.0	7	1	2.333	10	3	0.086	0.243	0.004	21.217	59.996	0.88
				0/1000	9/1000	3/1000								

91	root	z2v0Ma	100.0	14	1	1.75	120	8	0.029	0.129	0.151	0.192	0.853	0.79
				0/1000	61/1000	17/1000								
270	91	z2v1Ma	80.0	16	2	3.2	27	5	0.043	0.1	0.143	0.3	0.7	0.92
				0/1000	13/1000	19/1000								
47	root	z3r0mb	100.0	3	1	inf	3	0	0.101	0.148	0.004	25.66	37.876	0.98
				1/1000	1/1000	1/1000								
219	91	z3v1Ma	100.0	8	1	4.0	16	2	0.059	0.175	0.181	0.327	0.97	0.75
				0/1000	13/1000	0/1000								
58	root	z4r0mb	100.0	8	2	8.0	9	1	0.084	0.193	0.018	4.56	10.492	0.98
				0/1000	1/1000	0/1000								
200	91	z5f1pb	100.0	3	1	inf	3	0	0.201	0.243	0.004	55.584	67.128	1
				0/1000	0/1000	0/1000								
81	root	z5s1cb	100.0	3	1	inf	3	0	0.191	0.211	0.006	32.958	36.456	1
				0/1000	0/1000	0/1000								
187	91	z5v0Ma	100.0	4	1	inf	4	0	0.167	0.221	0.001	256.308	339.757	1
				0/1000	1/1000	1/1000								
173	116	z5v1Mb	67.0	4	1	inf	4	0	0.079	0.101	0.001	111.662	141.805	1
				1/1000	5/1000	5/1000								

Article 4: **Ecological traits of water bugs facilitate their acquisition of *Mycobacterium ulcerans* in Africa**

Solange Meyin A Ebong , Gabriel E. García-Peña, Dominique Pluot-Sigwalt, Laurent Marsollier, Philippe Le Gall[7], Sara Eyangoh[2], Jean-François Guégan[1]

Soumis à FEMS Microbiology Ecology

Ecology drives infection of water bugs with Mycobacterium ulcerans in Africa

Solange Meyin A Ebong[1,2,3,†,], Gabriel E. García-Peña[1,4], Dominique Pluot-Sigwalt[5], Laurent Marsollier[6], Philippe Le Gall[7], Sara Eyangoh[2], Jean-François Guégan[1]

[1]UMR MIVEGEC IRD, CNRS, Universités de Montpellier 1 et 2, Centre IRD de Montpellier, B.P. 64501, 34394 Montpellier Cedex, France

[2]Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274 Yaoundé, Cameroon

[3]Université de Yaoundé I, Laboratoire de Parasitologie et Ecologie, Faculté des Sciences, Yaoundé, Cameroon

[4]Centre de Synthèse et d'Analyse sur la Biodiversité (CESAB), 13857 Aix-en-Provence Cedex 3, France

[5]Museum National d'Histoire Naturelle, Département Systématique et Evolution, UMR7205 CNRS/MNHN, Paris, France

[6]Inserm Avenir ATOMycA CRCNA Inserm U892 & CNRS U6299, Université et CHU d'Angers, France

[7]UMR EGCE IRD, CNRS et Université Paris-Sud Orsay, Centre CNRS de Gif-sur-Yvette, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

[†]Corresponding author:ebongsolange@yahoo.fr

Key-words: Hemiptera, Mycobacterium ulcerans, Buruli ulcer, disease ecology

Running title: Water bugs infection by Mycobacterium ulcerans

Abstract

Mycobacterium ulcerans (MU), the causative agent of Buruli ulcer, is present in a wide spectrum of environments, including terrestrial and aquatic ecosystems in tropical and sub-tropical regions. The most promising studies suggest that some ecological settings favor infection of taxa with MU. However, these studies have not considered that some taxonomic lineages may be more susceptible to be infected with MU than others (phylogenetic signal of infection). Here, we investigated the relationships between ecological traits of several water bug families and their susceptibility toinfection with MU. To analyze these relationships while accounting for the phylogenetic signal of susceptibility, we performed phylogenetic comparative analyses on a large dataset of 11 families of water bugs collected in 10 different sites across Cameroon. We found that susceptibility to acquire MU of the two specific families, Belostomatidae and Naucoridae, correlated with their diet and habitat conditions. Our results indicate that MU circulates and infects taxa living in the aquatic vegetation and in the trophic network, independently of the phylogenetic signal of susceptibility. Furthermore this study presents a generalizable approach to analyzing the potential role of host ecology in the susceptibility to infection with an environmentally-persistent pathogenic microbe.

Introduction

Despite mobilization of the scientific community to understand the ecology of the causative agent of Buruli ulcer, M. ulcerans (MU) (Merritt et al. 2010; Ravensway et al. 2012; Heather R. Williamson et al. 2012), our capacity to mitigate human exposure to MU remains limited. Mainly, this limitation is due to the wide ecological niche of MU. MU is ubiquitous in aquatic ecosystems, associated with many aquatic invertebrates and vertebrates in tropical and sub-tropical regions (Garchitorena et al. 2014; Johnson et al. 2007; Lavender et al. 2011; Marsollier et al. 2002a; Marsollier et al. 2004a; Mosi et al. 2008a; Wallace et al. 2010; Williamson et al. 2008; Willson et al. 2013) and in temperate regions of Japan and Australia (MacCallum and Tolhurst 1948; OMS 2015); and is also present in terrestrial settings associated with mammals and biofilms on plants (Fyfe et al. 2010; Gryseels et al. 2012).

Because MU has a free living stage and infects a wide spectrum of taxa, identifying a specific host reservoir or a vector is elusive and even not plausible (Benbow et al. 2008). For example, previous studies suggested that Belostomatidae water bugs may be implicated as vectors in the transmission of MU to humans in natural settings of central African (Marsollier et al. 2002; Portaels et al. 1999), and that Naucoridae water bugs can accumulate MU in their salivary glands and expel them, under experimental conditions (Marsollier et al. 2002). However, the hypothesis that specimens from these two water bug families are acting as true vectors of MU is not supported by scientific evidence (Merritt et al. 2010; Plowright et al. 2008; Röltgen and Pluschke 2015). Belostomatidae and Naucoridae rarely bite humans, and these insects are not more abundant in Buruli ulcer endemic areas than in non-endemic ones (Benbow et al. 2008; Carolan et al. 2014). This lack of supporting evidence represents an important flaw when inferring vectorborne transmission of pathogens (Plowright et al. 2008). Thus, instead of searching for the host and vector of MU, more promising studies aim at identifying ecological settings that favor infection of taxa with MU; see (Garchitorena et al. 2015) for a recent work.

Current studies in aquatic ecosystems suggest that MU may be present on aquatic vegetation where it forms biofilms (Marsollier et al. 2004b; McIntosh et al. 2014), grow in low oxygen and moderated pH conditions (Palomino et al. 1998; Portaels and Pattyn 1982), be concentrated by filtering and grazing invertebrates, and be transmitted through predation up to higher levels of the aquatic trophic web (Marsollier et al. 2002; Marsollier et al. 2004a; Mosi et al. 2008; Portaels et al. 1999). Hence, the susceptibility of a taxon to be infected with MU could be based on its ecological niche rather than its taxonomic membership (Morris 2014). Nevertheless, these studies have not accounted for the possibility that some specific lineages may be more susceptible to infection with MU than others (here n phylogenetic signal of susceptibility).

Accounting for the tendency of related species to resemble each other (phylogenetic signal) is the foundation of phylogenetic comparative analyses (Felsenstein 1985; Harvey and Pagel 1991; Martins and Hansen 1997). Thus, phylogenetic comparative analyses are useful to examine the ecological relationships that favor MU infection whilst accounting for the phylogenetic signal of susceptibility. In this study, we benefited from the existence of a recent phylogeny of central African water bugs (Ebong et al. submitted) to perform a comparative analysis on the association between the ecology of water bug species with their susceptibility of infection with MU. Water bugs present a wonderful system to investigate ecological settings that favor infection of taxa with MU because of two reasons: some bugs are associated with MU (Marsollier et al. 2002a; Portaels et al. 1999; Benbow et al. 2008), and these taxa have a wide spectrum of ecological niches in aquatic ecosystems.

Heteroptera, or true bugs, constitute the sub-order of Hemiptera, the numerically important order of hemimetabole insects. Heteroptera are divided into seven infra-orders and three are found inaquatic and sub-aquatic environments: Nepomorpha, Gerromorpha and Leptopodomorpha (Polhemus and Polhemus 2007). Water bugs have developed many adaptations for living in fresh water and marine environments, e.g. specific habitat, diet, respiration, and active locomotion. These adaptations vary from one group to another (Andersen and Weir 2004; Chen et al. 2005; Parsons 1970; Poisson 1951; Poisson and Sallier 1970; Polhemus 1979; Schuh and Slater 1988). For example, they may use very different types of habitats: living on aquatic vegetation, near the bottom of the water column, living near or at the water surface, or near the river edge. Many diets are observed in water bugs such as macropredators that feed on large preys like fish and fresh water molluscs, micropredators, that feed on small preys, i.e. aquatic insect larvae, omnivores that eat both animal (protozoans) and plant (unicellular algae) matter which they select from the bottom layer or detritus (Andersen and Weir 2004), and scavengers/detritivorous that eat weakened or dead preys (Andersen and Weir 2004; Chen et al. 2005; Parsons 1970; Poisson 1951; Poisson and Sallier 1970; Polhemus 1979; Schuh and Slater 1988). In addition, several water bug taxa, like Belostomatidae, are able to fly and leave the aquatic environment to reach other locations (Duviard 1979). Also, respiration varies within water bugs accordingly to the type of aquatic habitat; this function is performed by several organs such as the siphon located at the posterior end of the abdomen, the ventral stigma and plastron. These dimensions determine the ecological niche of each bug species, by influencing the interactions of water bugs with the environment in which they live, and may also influence their susceptibility to acquire environmentally transmitted pathogens like MU.

Note that the present our study does not investigate the capacity of water bugs to transmit MU to human, but it focuses on the ecological settings that favor infection of other taxa with MU whilst accounting for the phylogenetic signal of susceptibility. Finally, we discuss about the

implications of these new findings for MU ecology and, more broadly, argue on the utility of comparative analysis to disentangle between the many different potential transmission pathways for other emerging disease systems for which few data are available.

Materials and methods

Sampling of water bugs across Cameroon, central Africa

All water bug specimens used in this study were collected monthly in 10 locations in Cameroon: two areas in which Buruli ulcer is endemic (Akonolinga and Bankim) and eight BU non-endemic areas (Mbalmayo, Abong-Mbang, Garoua, Tibati, Ngaoundéré, Bamenda, Buéa and Santchou) (Fig. 1). Water bugs were collected using two sampling methods: (1) directly in the aquatic environment with hauling a metallic dip net (32 × 32 cm and 1 mm in mesh size) within a surface of 1 m^2 and at different depth levels (down to a depth of 1 m), and (2) indirectly by using light trapping to capture winged imagos. Aquatic sampling including a large variety of streams, rivers, swamps and flooded areas was performed in triplicate each month, on three consecutive mornings. Light traps were installed twice a month in each site from 6:30PM to 11:00PM. Two survey periods were realized in 2011 (March to June) and 2012-2013 (September 2012 to February 2013) in the endemic zones (four times and six times respectively for each survey period) and non-endemic zones (2 times at each survey period). After collection, adults and nymphs were selected, counted, and preserved in 70% ethanol for further analysis.

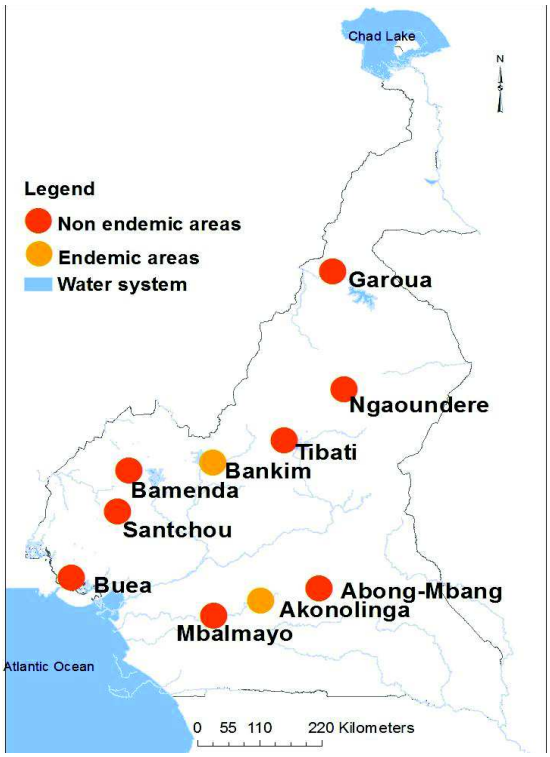


Figure 1. Mapping of different sampling sites of water bugs in Cameroon, central Africa.

Legend. Sampling sites are shown by the red circles and the water system of Cameroon is illustrated in blue color

Phylogeny of Hemiptera

We used a fragment of the mitochondrial gene coding for the first subunit of cytochrome oxidase (COI). Total DNA was extracted from legs or full body for small insects, using the NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel® 2012) according to the manufacturers' instructions. PCR amplifications were done in 20 µl reaction volumes containing 10 µM of each dNTP (Promega), 10 µM of each primer, 0,5 U of Taq DNA Polymerase (Promega), 1× PCR Buffer (Promega), and one µl of DNA extract. The gene fragments (COI) were amplified with the pairs of primers LCO 5'-GGT-CAACAAATCAAAAGATATTGG-3' and HCO 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'(Folmer et al. 1994). PCR always started with a denaturation step of 94°C for five minutes, followed by 25 cycles of one minute denaturation at 94°C, 1.5 minutes annealing at 50°C and one minute elongation at 72°C, and ended with a ten minutes final elongation at 72°C. PCR products were cleaned by Exosap-IT (Affymetrix® 2012), a single-step enzymatic clean up that eliminates unincorporated primers and dNTPs. The cleaned products were then sequenced to 690 base pair nucleotides. Multiple alignments were made using ClustalW according to the default settings: full multiple alignments with bootstrap number equal to 1000. Finally, we obtained 171 COI homologous sequences data set of 669bp. We corroborated the (99%) homology of our sequences with COI sequences obtained from BLAST-GenBank (GenBank® 2013), and added to our data set three additional sequences external to Heteroptera but from other family of Hemiptera (Cicadellidae) to enable us to direct the phylogenetic tree in time by rooting on these three taxa: Cicadella sp., Graphocephala atropunctata and Graphocephala cytura. References to these three genes in GenBank are respectively: gi262073319, gi227937213 and gi227937233.

We then reconstructed the phylogenetic relationships between water bugs identified in this study (171 sequences, described above, added to the three outgroup sequences from Genbank). To reconstruct the phylogeny we used maximum likelihood analysis and a general time-reversible model of sequence evolution and allowing for Gamma-distributed rate-heterogeneity (GTR + G + T) in the PhyML 3.0 program (Guindon et al. 2010). The model of evolution used was the best model found by Jmodel test procedure (Posada 2008) (See supplementary Table 1). The phylogenetic tree obtained is presented in Figure 2.

Ecology of water bugs

To represent the ecology of water bugs we considered flying capacity, habitat use, and diet of water bugs, which are dimensions of their ecology that may facilitate susceptibility to infection with MU. Information on the ecology of water bugs was obtained from the scientific literature at the family level, since no information at species level is currently available in the present literature (Andersen and Weir 2004; Chen et al. 2005; Parsons 1970; Poisson 1951b; Poisson and Sallier 1970; Polhemus 1979; Schuh and Slater 1988). First, we hypothesized that water bugs able to fly could acquire MU in reaching infected aquatic sites, thus we analyzed the correlation between susceptibility to infection with MU and flying capacity of each water bug taxa. Second, we categorized four different types of habitat commonly used by those aquatic Hemipterans: living on aquatic vegetation, living near the bottom of the water column, living near or at the water surface, and living near the river edge. Finally, because water bugs could acquire MU through consumption of some preys or when foraging at the bottom of the water column, we identified four different

feeding habits: omnivores that eat both animal (protozoa) and plant (unicellular algae) matter which they select from the bottom ooze layer or detritus, micropredator that feeds on small preys like other aquatic insect larvae, macropredator that feeds on large preys or macropreys (fish and freshwater mollusk) and scavenger/detritivorous that eats weakened or dead prey (Andersen and Weir 2004; Chen et al. 2005; Parsons 1970; Poisson 1951b; Poisson and Sallier 1970; Polhemus 1979; Schuh and Slater 1988). For each water bug family, the presence or absence of each ecological trait was coded in a binary system: 1 = presence of trait and 0 = absence of trait (see Table 1).

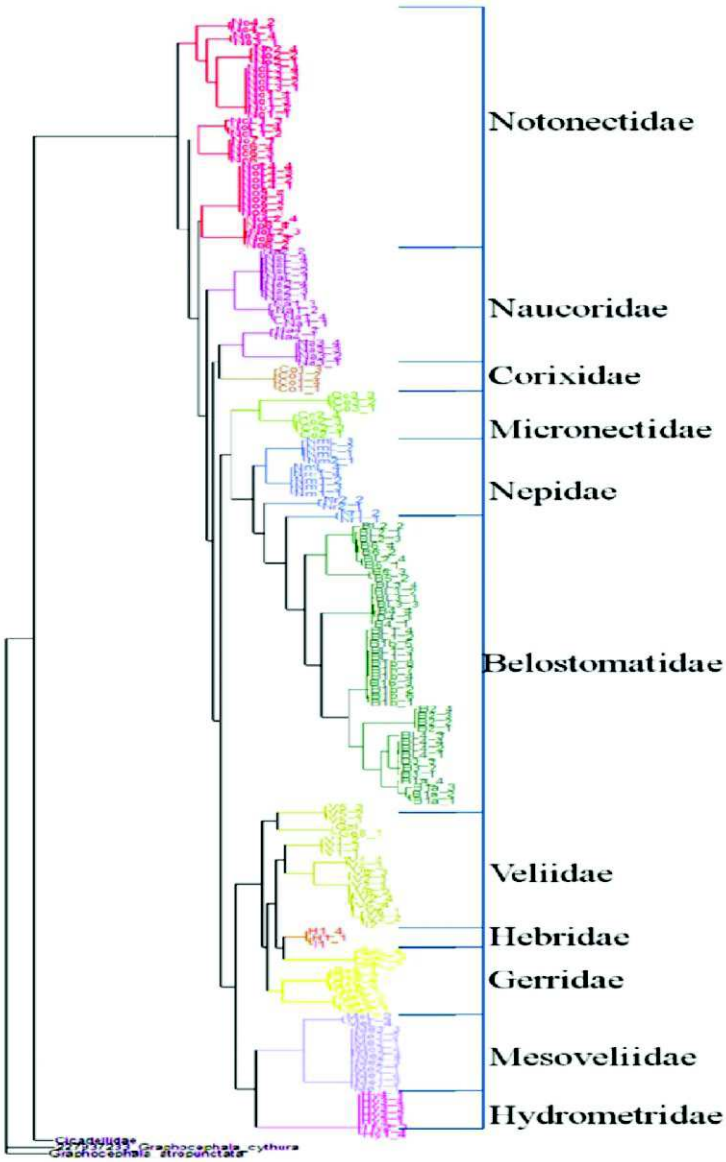


Figure 2. Phylogenetic relationships between taxa inside each aquatic bug family.

Phylogenetic tree shows the relationships between water bugs taxa used in this study; all taxa belonging to the same family are grouped together and each family is represented by one color. See text for further details on methods.

Table 1. Binary coded for presence and absence of ecological traits according to the different water bug families present in Cameroon. 0 corresponds to absence of ecological trait and 1 corresponds to its presence.

Wter bugs Families	Flying	Habitat capacity	Vegetation	Water surface	Edge	Bottom	Diet Omnivorous	Macro-predator	Micro-predator	Detritivorous
Belostomatidae	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
Corixidae	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
Micronectidae	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
Naucoridae	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
Nepidae	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
Notonectidae	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
Gerridae	1	0	1	0	0	0	0	1	0	
Hydrometridae	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
Mesoveliidae	1	0	1	0	0	0	0	1	0	
Veliidae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Hebridae	0	1	0	0	0	0	0	1	0	

Data analysis

We analyzed our data in three steps. First, we assessed the phylogenetic signal of all traits investigated, by fitting a likelihood model of discrete character evolution (Pagel 1997). Maximum likelihood was used to fit the data and the water bug phylogeny, while assuming that character transition rates, from 0 to 1 and from 1 to 0, were independent of each other. Statistical inference of phylogenetic signal was assessed by performing (LR) Likelihood Ratio' tests with 1 degree of freedom, comparing the likelihoods of the models fitted to the data and the phylogeny with the likelihoods of the models assuming no covariance between related taxa (i.e. no phylogenetic signal represented by a star shape phylogeny).

Second, we used BayesTraits (Barker and Pagel 2005) to test the evolutionary correlations between susceptibility to acquire MU and the ecological traits of water bugs, across the Heteropteran phylogeny. Evidence of correlated evolution between an ecological trait and susceptibility to acquire MU was assessed by LR' tests (Werner) comparing the likelihoods of two models fitted to the data and the phylogeny (Pagel 1997): (1) a model suggesting independent evolution between the ecological trait and susceptibility, and (2) a model suggesting a correlated evolution between both traits (Fig. 3). In the independent model, four parameters (q) represented the back- and forward transitions between the states of each of the two binary traits, whereas in the correlated model eight parameters represented the back- and forward transitions between the four combinations of coevolved states (Fig. 3). These models were fitted to the data by a maximum likelihood approach iterated 1000 times to ensure consistency in the maximum likelihood values. Statistical significance of the LR' tests was assessed by assuming that LR was asymptotically distributed as a X^2 with degrees of freedom equal to the difference in the number of parameters between the two models (Pagel 1997).

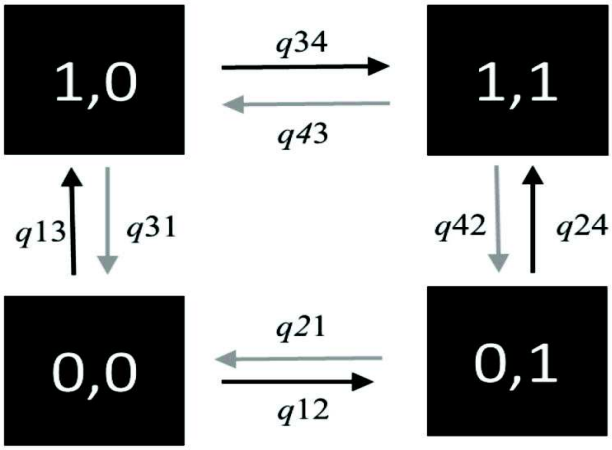


Figure 3. Diagram of the four transitional states of the correlated evolution between two traits {x,y}. A given ecological trait and susceptibility to acquire Mycobacterium ulcerans (y) hereafter called MU. Transition rate parameters (q) describe the transitions between states of correlated evolution ({0,0}, {0,1}, {1,0}, {1,1}). While considering back (grey arrows) and forward transitions (black arrows) of the correlated evolution, we examined evidence that the ecological trait evolved faster than host susceptibility to acquire MU (q13 > q12), and susceptibility to acquire MU was facilitated by the ecological trait (q34 > q24).

Finally, we investigated our hypotheses by examining the pathways of coevolution between susceptibility to infection with MU and the ecological traits for which correlated evolution was supported by maximum likelihood methods. Accordingly to the hypothesis that ecology may facilitate susceptibility to infection with MU (e.g. by proximate contact) we predicted that evolutionary changes in ecological traits preceding changes in susceptibility must occur at faster rates than transitions in susceptibility preceding changes in ecological traits. This predicts that q13 > q12, q34 > q12, and q34 > q24 in our correlated model of evolution (Fig. 3). To test these differences whilst ensuring robustness in our comparisons, we used the Bayesian framework of BayesTraits to examine the estimates of the transition rate parameters (Pagel et al. 2004). The correlated model of evolution was fitted to the data in a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) procedure, iterated 5,050,000 generations, a burnin period of 50,000 and assuming an exponential distribution ($1.5\ e^{-1.5x}$) of the priors (See supplementary Table 2 – Table 4). During the MCMC procedure the Markov chain was sampled every 1000 generations producing 5001 independent samples of the posterior distribution of the transition rate parameters (see Supplementary Figure 1). These samples were then examined and compared with Mann-Whitney Wilcox' test (W), as the distribution of the posterior values was not normal (see Supplementary Figure 2). Furthermore, to corroborate that the transition rate parameters estimated were substantially different, we compared the marginal likelihoods of the model of correlated evolution and a null model assuming that all forward transitions occur at the same rate (q12 = q13 = q24 = q34). The harmonic mean (H) of the log likelihood in the Markov chain was used as surrogate of the marginal likelihood, and statistical differences were accepted if 2 < to the log Bayes factor ($BF = 2\times(H_{\text{correlated model}} - H_{\text{null model}})$).

Results

Susceptibility of infection with MU had a substantial phylogenetic signal (LR = 181.7 p < 0.0001), and likewise all ecological traits considered in this study (Table 2).

Correlated evolution between ecological traits and susceptibility to acquire MU

Our results described in Table 2 suggest that susceptibility to infection with MU was correlated with two categories of the habitat. Susceptibility to acquire MU was associated with inhabiting in the aquatic vegetation (LR = 17.9, p = 0.001) and at the bottom of the aquatic ecosystems (LR = 16.1, p = 0.003). Additionally, our results supported that susceptibility to acquire MU was associated with a macropredator diet (LR = 12.8, p = 0.012). The other ecological traits tested were not substantially correlated with susceptibility to acquire MU see (Table 2).

Table 2. Log-Likelihood (Lh) of the two models (correlated and independent evolution) fitted to the data and the phylogeny

		Phylogenetic signal; LR (p)	$Lh_{correlated}$	$Lh_{independent}$	LR	*p* (*df* =4)
Flying capacity		187.1 (< 0.0001)	-34.31	-35.84	3.08	0.545
Habitat	**Aquatic vegetation**	**181.3 (< 0.0001)**	**-25.85**	**-34.78**	**17.86**	**0.001**
	Bottom	**111.1 (< 0.0001)**	**-20.35**	**-28.39**	**16.09**	**0.003**
	Water surface	63.8 (< 0.0001)	-24.73	-27.04	4.62	0.329
	River edge	110.8 (< 0.0001)	-23.93	-26.48	5.1	0.277
Diet	Omnivores	64.3 (< 0.0001)	-22.9	-24	2.3	0.688
	Micropredator	143.2 (< 0.0001)	-23.3	-25.4	4.2	0.374
	Macropredator	**195.5 (< 0.0001)**	**-21.9**	**-28.3**	**12.8**	**0.012**
	Scavenger/detritivorous	90.8 (< 0.0001)	-23.6	-26.3	5.5	0.239

A likelihood ratio test compares the Lh of the two models, and a p- value is estimated considering a χ^2 distribution with degrees of freedom as the difference in the number of parameters between the two models.

Legend: Variables in bold characters are statistically significant (see text for further details).

Co-evolutionary pathways of susceptibility to acquire MU and ecological traits

Analysis on the co-evolutionary pathways (Fig. 4) contradicted our hypothesis by suggesting that living at the bottom of the water column may not facilitated susceptibility to acquire MU. The rates of forward transitions between living at the bottom of the water column and susceptibility to acquire MU were not substantially different (log BF = -1.1). Nevertheless, some evidence supports our hypotheses suggesting that the ecology of water bugs favored susceptibility to acquire MU (Fig. 4). First, once that we assured that transition rate parameters were statistically different (log BF = 2.9), we found that the behavior of living in aquatic vegetation may have facilitated acquisition of MU. The transition rate q13 was larger than q12 (W = 6194510, P < 0.0001), and q34 > q12 (W = 3183621, P < 0.0001), respectively. Finally, macropredator behavior was likely to facilitate acquisition of MU because q13 > q12 (W = 7829025, P < 0.0001) q34 >

q24 (W = 8813184, P < 0.0001); and q34 > q12, (W = 461620.5, P < 0.0001). These differences were substantial compared with the null model (log BF = 4.9).

Discussion

We found evidence that susceptibility to infection with Mycobacterium ulcerans has a substantial phylogenetic signal, and this suggests that related water bugs resemble each other in their susceptibility to infection with MU. Notably, without scientific information about the dates of speciation of MU, our results should not be considered as evidence of coevolution between water bugs and MU. In this regard, a seminal study suggests that MU evolved recently by local adaptation and genome reduction, but no information exists on the actual dates of speciation (Stinear et al. 2007). Hence, instead of arguing a tight host-pathogen co-evolution, we further suggest and demonstrate that the ecological niche of some water bugs, commonly shared by related taxa, may facilitate infection with MU. Our study shows that ecological traits may predispose water bug taxa to acquire MUfrom the aquatic environment. To understand why some water bugs' families may acquire MUand others not it is important to study the interactions between these insects, their ecology and their environment. For this, we selected several ecological traits such as habitat preference, diet and flying capacity to bring out the association between the ecology of water bugs and their susceptibility to infection with MU. Among these ecological traits, susceptibility to infection with MU did not correlate with the flying capacity of taxa but it was correlated to the diet and the habitat. Indeed, information on susceptibility to infection with MU correlated statistically with ecological traits like feeding upon macropreys, living near the bottom of the water column and living on the aquatic vegetation.

The maximum likelihood values of directional and transition rates between susceptibility to MU and ecological traits of water bugs suggest that, feeding upon macropreys facilitate infection of water bugs with MU. Water bug families like Belostomatidae and Naucoridae feed mainly upon macropreys such as freshwater molluscs and small freshwater fish which could also be infected with MU because they feed upon aquatic vegetation (Marsollier et al. 2002; Marsollier et al. 2004a; Mosi et al. 2008; Portaels et al. 1999). Furthermore, our results support the hypothesis of a direct infection with MU of animals living in the immerged aquatic vegetation. MU exists in biofilms on the aquatic vegetation (Marsollier et al. 2004b; McIntosh et al. 2014), thus this possibility is highly plausible.

Overall, our findings support that MU is transmitted within the trophic chains of aquatic ecosystems (Roche et al. 2013), and directly from preying upon bacterial biofilms on aquatic plants (Portaels 1999; Marsollier 2002; Marsollier 2004a; Mosi 2008). However, there is no evidence that living at the bottom of the water column may directly facilitate infection of Hemipteran insects with MU. Remarkably, this is despite the fact that the bacterium prefers aquatic conditions found in this habitat, with low oxygen, relatively high temperature and moderately acid pH values (Palomino et al. 1998; Portaels and Pattyn 1982). These new findings provide new insights on how these insects may acquire bacilli in relation to their habitat use and food consumption behaviour. Setting a limit to the present work, we do not attempt to demonstrate a vector-borne transmission by water bugs for MU, which is definitely not the scope here, but attempts to show the role of host ecology versus host phylogeny in their susceptibility to acquire, or not, MU.

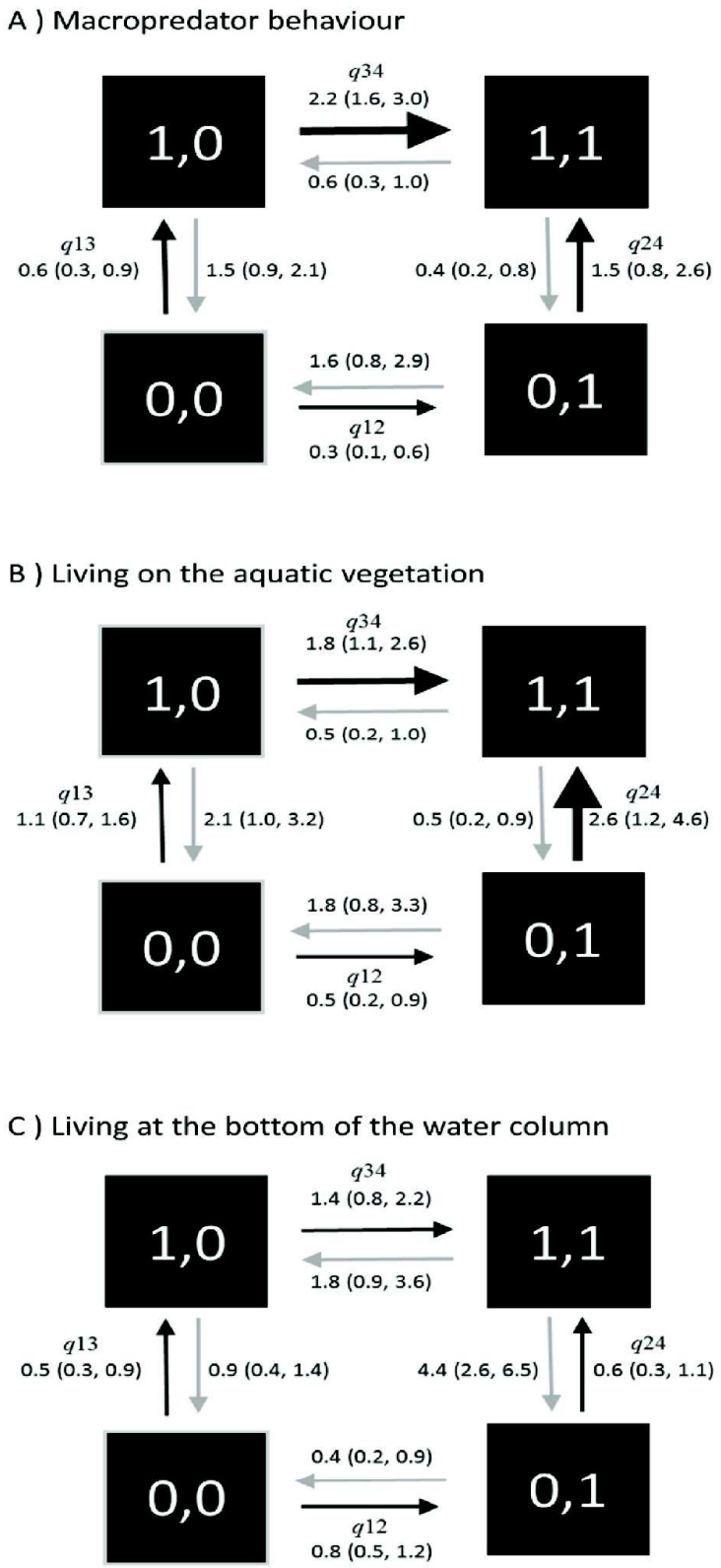


Fig. 4 : Evolutionary pathways of correlated evolution between susceptibility to acquire *M. ulcerans* (MU) and some Hemiptera ecological traits.

Legend. (A) Macro-predator behaviour, (B) Living in aquatic vegetation; and (C) Living at the bottom of the water column. Accordingly to the hypotheses we expected that q13 > q12, q34 > q12, and q34 > q24. Median of the transition rates are presented and 1st and 3rd quantiles are in parentheses. Comparisons of the transition rates support our hypothesis by showing that (A) Macro-predator behaviour preceded, and may facilitated susceptibility to acquire MU acquisition by water bugs. Likewise, (B) living in the aquatic vegetation evolved at faster rates than susceptibility to acquire MU (q13 > q12), and this may facilitated the evolution of MU acquisition by bugs (q34 > q12). (C) The transition rates of the correlated evolution between susceptibility to MU acquisition and living at the bottom of the water column were not statistically different form each other (log BF = -1.1). Forward transitions are presented in black arrows, backwards transitions are presented in grey arrows, and grey frames represent the most probable (P) ancestral state estimated by BayesTraits (A: $P_{\{0,0\}} = 0.75$; B: $P_{\{0,0\}} = 0.48$, $P_{\{1,0\}} = 0.42$; C: $P_{\{0,0\}} = 0.91$).

Conclusion

In summary, this study shows how it is possible to disentangle ecological settings favoring the infection of insect hosts with an environmentally-persistent pathogenic microbe. It also contributes to eliminate some potential routes of infection, and favors the more probable pathways for this disease agent. Overall, the statistic comparative methodology we used in this work can be reproduced for other emerging infections in order to better understand the ecology of pathogens, notably when relatively poor information are available.

Funding

This work was supported by a grant from the French National Research agency (ANR 11CEPL-00704 EXTRA-MU) with additional funding from (JEAI ATOMyc) the Young International Research Team of Agence Inter-Etablissement de Recherche pour le Développement/Institut de Recherche pour le Développement (AIRD/IRD), a PhD studentship from AIRD/IRD from the “Département de Soutien à la Formation” to Solange Meyin A Ebong. GEGP received a post-doctoral fellowship from Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB) through its Centre de Synthèse et d'Analyse sur la Biodiversité (CESAB) and its funded working group programme “Disentangling the linkages between biodiversity and emerging infectious diseases” (BIODIS).

Acknowledgements

We thank the staff at the Département Systématique et Evolution at Museum National d’Histoire Naturelle Paris, France notably Eric Guilbert and Laurent Fauve who introduced me to morphological taxonomy techniques and assisted me a lot in the biobliographique research on Afro-tropical water bugs

The Collaboration with Professor Myriam Harry allowed us to obtain the sequences of aquatic bugs that were used in this study. We present our gratitude.

References

Affymetrix®. USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup. User manual 2012.

Andersen NM and Weir TA. Australian water bugs their biology and identification (HemipteraHeteroptera, Gerromorpha & Nepomorpha). Entomonograph14: 2004.

Barker D and Pagel M. Predicting Functional Gene Links from Phylogenetic-Statistical Analyses of Whole Genomes. PLoS Comput Biol 2005; 1(1): 0024-0031.

Benbow ME, Williamson H, Kimbirauskas R, et al. Aquatic Invertebrates as Unlikely Vectors of Buruli Ulcer Disease. Emerg Infect Dis2008; 14(8): 1247-1254.

Carolan K, Ebong SM, Garchitorena A et al. Ecological niche modelling of Hemipteran insects in Cameroon; the paradox of a vector-borne transmission for Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer. Int J Health Geogr 2014; 13(44):1-11.

Chen P., Nieser N and Zettel H. the aquatic and semi-aquatic bugs (Heteroptera: Nepomorpha and Gerromorpha) of Malesia. Fauna Malesiana Handbook 2005.

Duviard D. Flight Activity of Belostomatidae in Central Ivory Coast. Oecologia 1979; 15: 321 - 28.

Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method. American Naturalist 1985; 125: 1-15.

Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 1994; 3(5): 294-99.

Fyfe JAM, Lavender CJ, Handasyde KA, et al. A major role for mammals in the ecology of Mycobacterium ulcerans. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(8): 1-12.

Garchitorena, A., Guégan JF, Léger L, et al.Mycobacterium ulcerans dynamics in aquatic ecosystems are driven by a complex interplay of abiotic and biotic factors. Elife 2015; 4(e07616): 1-19.

Garchitorena A, Roche B, Kamgang R, et al.Mycobacterium ulcerans Ecological Dynamics and Its Association with Freshwater Ecosystems and Aquatic Communities: Results from a 12-Month Environmental Survey in Cameroon.PLoS Negl Trop Dis2014; 8(5): 1-11.

GenBank®. The NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences. 2013.

Gryseels S, Amissah D, Durnez, et al. Amoebae as potential environmental hosts for Mycobacterium ulcerans and other mycobacteria, but doubtful actors in Buruli ulcer epidemiology. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1764.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, et al.New Algorithms and Methods to Estimate MaximumLikelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. Syst Biol 2010; 59(3): 307321.

Harvey PH and Pagel MD The comparative method in evolutionary biology. Oxford University Press, Oxford 1991.

Johnson PD, Azuolas J, Lavender CJ, et al.Mycobacterium ulcerans in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. Emerg Infect Dis 2007; 13: 1653.

Lavender CL, Fyfe JA, Azuolas J et al.Risk of Buruli ulcer and detection of Mycobacterium ulcerans in mosquitoes in southeastern Australia. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5: e1305.

MacCallum P and Tolhurst JC. A new mycobacterial infection in man. J Pathol Bacteriol 1948 60: 93.

Macherey-Nagel®. NucleoSpin, Tissue Genomic DNA from tissue. User manual 2012 1-50.

Marsollier L, Robert R, Aubry J, et al. Aquatic Insects as a Vector for Mycobacterium ulcerans J Appl Environ Microbiol2002; 68(9): 4623-4628.

Marsollier L, Stinear T, Aubry J, et al. Aquatic Snails, Passive Hosts of Mycobacterium ulcerans. Appl Environ Microbiol 2004a; 70(10): 6296-6298.

Marsollier L, Stinear T, Aubry J, et al.Aquatic Plants Stimulate the Growth of and Biofilm Formation by Mycobacterium ulcerans in Axenic Culture and Harbor These Bacteria in the Environment. Appl Environ Microbiol 2004b; 70(2): 1097-1103.

Martins EP and Hansen TF Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. Am Nat1997; 149: 646-667.

McIntosh M, Heather W, Benbow ME, et al. Associations Between Mycobacterium ulcerans and Aquatic Plant Communities of West Africa: Implications for Buruli Ulcer Disease. EcoHealth 2014; 11: 184-196.

Merritt RW, Walker ED, Small PLC, et al. Ecology and Transmission of Buruli Ulcer Disease: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(12): 1-15.

Morris AL Identifying Biological and Environmental Indicators of Emerging Infectious Diseases: The case of Buruli Ulcer. Thesis, 2014.

Mosi L, Heather W, Wallace JR, et al. Persistent Association of Mycobacterium ulcerans with West African Predaceous Insects of the Family Belostomatidae. Appl Environ Microbiol 2008; 74(22): 7036-7042

Mosi L, Williamson H, Wallace JR, et al.Persistent Association of Mycobacterium ulcerans with West African Predaceous Insects of the Family Belostomatidae. Appl Environ Microbiol2008; 74(22): 7036-7042.

OMS Annual meeting on Buruli ulcer. http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx 2015.

Pagel M Inferring evolutionary processes from phylogenies. Zool Scr 1997; 26: 331-348.

Pagel M, Meade A, Barker D Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. Syst Biol 2004; 53: 673-684.

Palomino JC, Obiang AM, Realini L, et al. Effect of Oxygen on Growth of Mycobacterium ulcerans in the Bactec System. Clin Microbiol Rev 1998; 36(11): 3420-3422.

Parsons MC Respiratory significance of the thoracic and abdominal morphology of the three aquatic bugs Ambrys, Notonecta and Hesperocorixa (Insecta, Heteroptera). Zeitschrift für Morphologie das Tiere 1970; 66: 242-298.

Plowright RK, Sokolow SH, Gorman ME, et al. Causal Inference in Disease Ecology: Investigating Ecological Drivers of Disease Emergence. Front Ecol Environ 2008; 6(8): 420-429.

Poisson R. Contribution à l'étude des Hydrocorises de Madagascar (Mission J. Millot 1947-1948). Inst Sc Mad 1951b; 5(1): 79-130.

Poisson R. and Sallier DD. Contribution à l'étude biologique des Hétéroptères aquatiques du Sénégal septentrional 3. Bulletin de l' I.F.A.N 1970; 32(3): 832- 841.

Polhemus JT. Family Naucoridae Pp. 131-138 in Menke, A. S. (Ed.): The Semiaquatic and Aquatic Hemiptera of California (Heteroptera: Hemiptera). Bulletin of the Californian Insects Surveys 1979.

Polhemus JT and Polhemus DA. Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. Hydrobiologia 2007.

Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, et al. Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection. Lancet 1999; 353: 986.

Portaels F and Pattyn SR. Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. Ann Inst Pasteur Microbiol 1982; 133(2): 213-221.

Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol Biol Evol 2008; 25(7): 1253–1256.

Ravensway JV, Benbow E, Tsonis AA, et al. Climate and Landscape Factors Associated with Buruli Ulcer Incidence in Victoria, Australia. PLos One 2012; 7(12): 1-11.
Roche B, B. M. E., Merritt R., Kimbirauskas R., et al. Identifying the Achilles heel of multi-host pathogens: the concept of keystone 'host' species illustrated by Mycobacterium ulcerans transmission. Environ Res J 2013; Letters 8.

Röltgen, K. and G. Pluschke Mycobacterium ulcerans Disease (Buruli Ulcer): Potential Reservoirs and Vectors. Curr Clin Microbiol Rep 2015; .2: 35-43.

Schuh RT and Slater JA. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) classification and Natural History. Cornell University Press, Ithaca and London 1988.

Stinear TP, Seemann T, Pidot S, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer. Genome Res 2007; 17(2): 192-200.

Wallace J R, Gordon MC, Merritt RW, et al. Interaction of Mycobacterium ulcerans with Mosquito Species: Implications for Transmission and Trophic Relationships. Appl Environ Microbiol2010; 76(18): 6215–6222

Werner U. NODF – a FORTRAN program for nestedness analysis User manual 2012.Williamson HR, Benbow ME, Campbell LP, et al. Detection of Mycobacterium ulcerans in the Environment Predicts Prevalence of Buruli Ulcer in Benin. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(1-9).

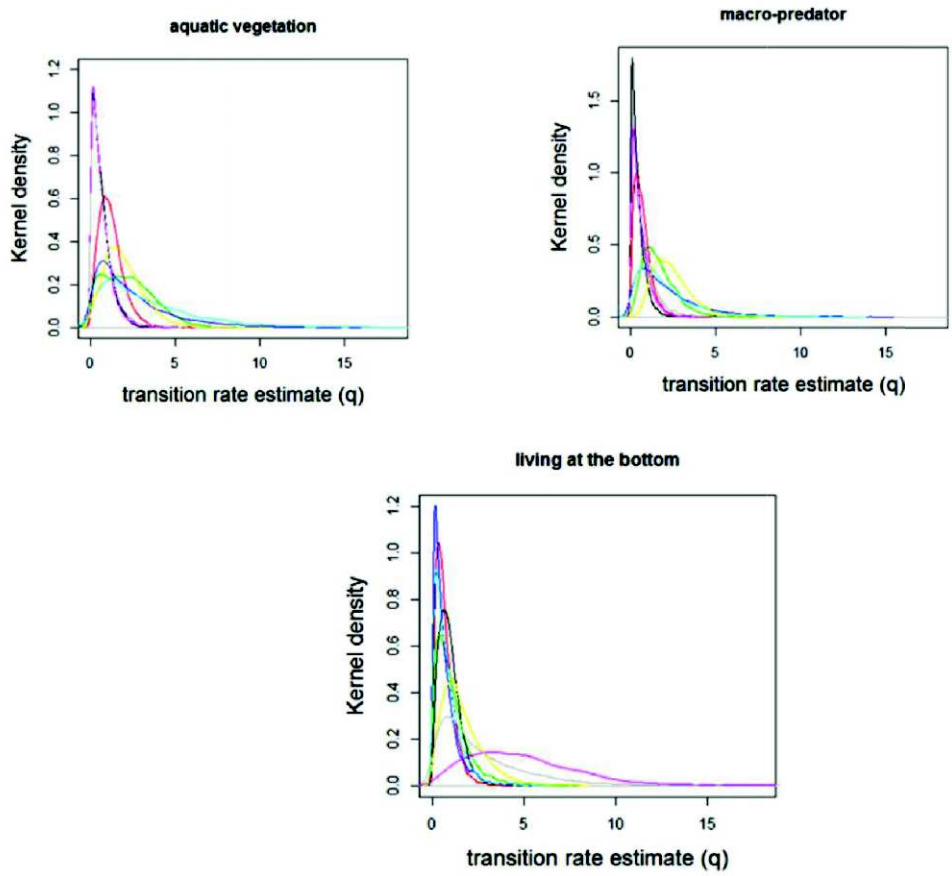
Williamson HR,.Benbow ME, Nguyen KD et al. pDistribution of Mycobacterium ulcerans in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2: e205.

Willson SJ, Kaufman MG, Merritt RW et al. Fish and amphibians as potential reservoirs of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer disease. Infect Ecol Epidemiol 2013; 3: 19946 1-13.

Supplementary material

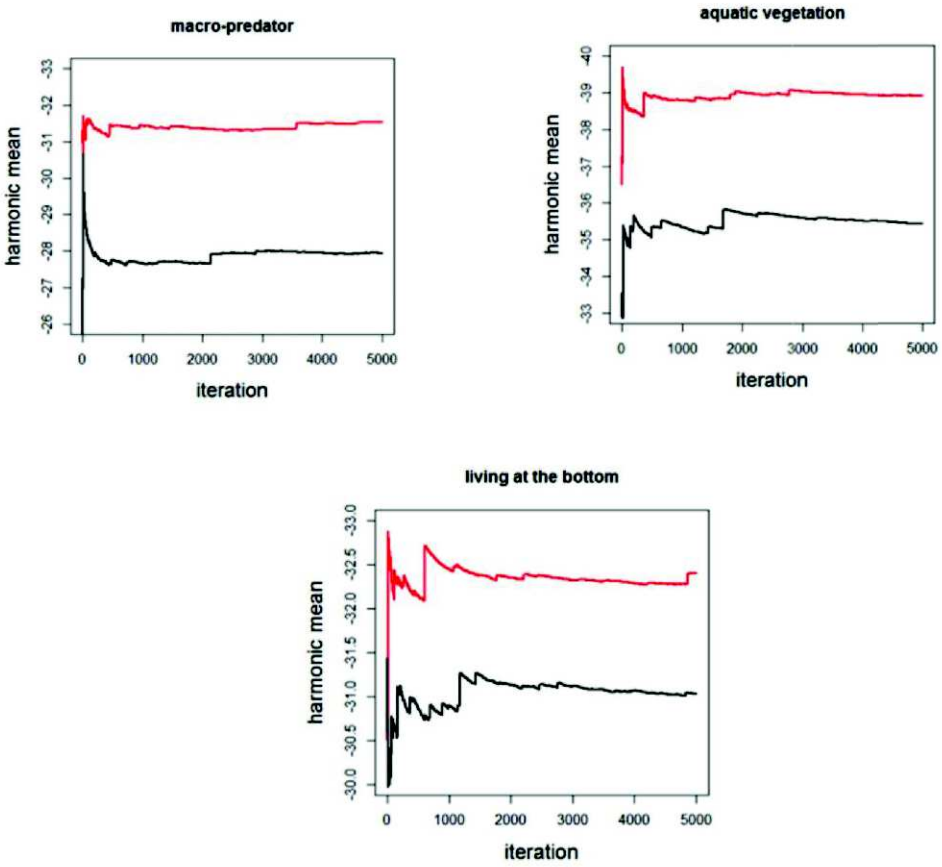
Supplementary Table 1. Evolution models of nucleotide sequences (voir article 1)

Analysis was performed using JModelTest. The likelihood scores was calculated with PhyML for 88 candidate models and number of substation schemes equal to 11. Akaike's test allowed to select the best model (GTR+I+G) with following settings: Partition = 012345, negative log likelihood (-InL) = 12489.6675, number of estimated parameters (K) = 356, P-inv = 0.0000, Gamma shape = 0.2310



Supplementary Figure1. Distributions of the posterior estimates of the transition rates (q) of the correlated models of evolution.

Prior distribution was assumed exponential (1.5 $e^{-1.5x}$).



Supplementary Figure2. Models correlation between the ecological traits and susceptibility to Mycobacterium ulcerans (MU)

They found by the Maximum likelihood procedure were corroborated by the Bayesian approach of Bayes Traits. The harmonic mean was used as surrogate of the marginal likelihood to compare the fit of two models: one suggesting the correlated model of evolution of an ecological trait and susceptibility to MU, and other model suggesting the independent evolution of these two traits (red). To assess statistical inference was assessed by the log Bayes Factor (log BF) = 2(log $H_{\text{correlated model}} - \log H_{\text{independent model}}$). These estimates suggest positive evidence for the correlation (logBF > 2) between susceptibility to MU and the ecological traits: macropredator (logBF = 7.2), living in aquatic vegetation (log BF = 7.0), and living at the bottom of the water column (log BF = 2.8).

CHAPITRE 4
Introduction à l'étude de la biodiversité et à la macroécologiedes punaises aquatiques du Cameroun

Le chapitre 4 est consacré à l'étude de la structure et la composition des communautés de punaises aquatiques du Cameroun à travers les notions de diversité biologique et de macroécologie. Dans un premier temps, nous avons évalué l'effort d'échantillonnage à différents niveaux d'agrégation des données (national, par grandes zones et par sites d'échantillonnage) en étudiant les courbes de saturation de recrutement d'espèces. Les indicateurs de diversité biologique calculés par la suite ont permis de connaître la structure de ces communautés au Cameroun. Mais avant ces calculs, nous avons recherché les facteurs de biais d'échantillonnage à l'origine des manquements observés dans notre étude. Enfin, des modèles linéaires généraux ont été développés en fixant deux paramètres (échantillonnage total par site et distance kilométrique de chaque site par rapport à Yaoundé) dans le but de rechercher les patrons macro-écologiques potentiellement explicatifs de la diversité des punaises aquatiques observée au Cameroun. L'article 4 suivant présente les résultats obtenus.

Introduction

Issu de la contraction de l'expression « diversité biologique », le terme biodiversité fait référence à la diversité du vivant sous toutes ses formes ; elle comprend des échelles très diverses : du gène à l'écosystème en passant par les individus, les populations, et les espèces. Cette définition très large, qui permet d'englober toute la complexité de cette notion, a été donnée pour la première fois en 1992 lors de la convention sur la diversité biologique ; rapport du "Secretariat of the Convention on Biological Diversity" [1]. L'étude de la diversité biologique des communautés d'espèces conduit aux questionnements tel que : combien d'espèces sont-elles présentes ? Quelles sont leur identité et leurs caractéristiques ? Comment sont-elles reparties dans l'espace et dans le temps ? Les réponses à ces différentes questions intègrent la notion de macroécologie.

Selon [2], la macroécologie est la science qui étudie les relations entre les organismes et leur environnement à large échelle spatiale et/ou temporelle, impliquant la caractérisation et l'explication statistique des patrons d'abondance, de distribution spatiale et de diversité spécifique. La macroécologie explore plusieurs autres domaines de la biologie incluant l'écologie, la biogéographie et la macroévolution [3]. L'écologie étudie les conditions d'existence des êtres vivants et les interactions existant entre ces êtres vivants entre eux d'une part et entre les êtres vivants et leur milieu de vie d'autre part. La biogéographie, quant à elle, étudie la distribution des êtres vivants dans le temps et dans l'espace [4]. La macroévolution, enfin, s'intéresse à l'histoire des êtres vivants au travers de leurs relations phylogénétiques [2]. Plus récemment, la biogéographie et la macroévolution se sont rapprochées pour mieux comprendre l'histoire évolutive des taxa.

La présente étude porte sur le Cameroun, pays de l'Afrique centrale dont la diversité de cultures, de reliefs et de climats font de lui une Afrique en miniature. Cette diversité offre des conditions favorables au développement d'une forte diversité biologique animale et végétale. Issus de cette biodiversité, nous avons étudié les Hétéroptères ou vraies punaises, un sous-ordre de l'ordre des Hémiptères qui est divisé en 7 infra-ordres dont trois sont rencontrés en milieux aquatiques et sub-aquatiques dans tous les continents sauf l'Antarctique [5]. Depuis les travaux anciens de [6-8] sur les punaises aquatiques du Cameroun, ces insectes ont été oubliés des études scientifiques pendant plusieurs décennies. Mais leur implication probable dans la transmission de Mycobacterium ulcerans (agent responsable de l'ulcère de Buruli)

signalée dès les années 2000 [9,10] a suscité un nouvel intérêt pour leur étude [11-13]. Cependant, pour mieux élucider un éventuel rôle que joueraient les punaises aquatiques dans l'écologie et la transmission de M. ulcerans, il est très important de connaître leur systématique et leur biologie. Ainsi, nous nous sommes intéressés à deux des trois infra-ordres rencontrés en milieux aquatiques et subaquatiques, les Nepomorpha et les Gerromorpha) ; ceci dans le but de mieux comprendre la distribution et l'organisation de leur diversité biologique au Cameroun ainsi que leur potentiel rôle dans la transmission de la mycobactérie causant l'ulcère de Buruli.

Matériel et Méthodes

1. Echantillonnage des espèces de punaises aquatiques au Cameroun

Certaines espèces de punaises aquatiques sont capables de quitter le milieu aquatique en volant et sont attirées la nuit par la lumière [14,15] ; d'autres préfèrent rester sous l'eau à une certaine profondeur, et d'autres enfin sont positionnées à la surface de l'eau ou sur la végétation aquatique.

Afin d'augmenter les chances d'échantillonner la totalité des espèces existant dans nos différents sites camerounais, nous avons utilisé deux méthodes d'échantillonnage : 1) les échantillonnages directs en milieu aquatique à l'aide d'une épuisette métallique de 32cm x 32cm de côté avec un diamètre des mailles de 1mm, le tout relié à un manche métallique de 1m (Figure 1A) ; 2) les échantillonnages indirects à l'aide d'un piège lumineux constitué d'un générateur électrique relié à une ampoule de 250 watts par un câble électrique, deux draps blancs dont un fixé sur deux poteaux plantés au sol et le second installé au sol, et destinés à accueillir les insectes attirés par la lumière (Figure 1B). Pour les échantillonnages directs, toutes les punaises collectées après 10 coups d'épuisette à un même endroit forment un même échantillon. Pour les échantillonnages par piège lumineux, toutes les punaises capturées en une soirée (le piège était installé dès la tombée de la nuit jusqu'à 22 heures) constituent un même échantillon.

Les échantillonnages ont été réalisés dans 10 sites au Cameroun dont 2 sites endémiques à l'ulcère de Buruli (Akonolinga et Bankim) et 8 sites non endémiques/non épidémiques à l'ulcère de Buruli (Abong-Mbang, Bamenda, Buéa, Garoua, Mbalmayo, Ngaoundéré, Santchou, Tibati) (Figure 2). Deuxcampagnes d'échantillonnage ont été réaliséesen 2011 (mars àjuin) et 2012-2013 (septembre 2012 à février 2013), et ce tous les mois. En raison des difficultés géographiques ou géopolitiques à accéder à certains sites et du coût des missions sur le terrain, des échantillonnages ont été intenses dans trois sites situés le long du fleuve Nyong. Il s'agit d'Abong-Mbang en amont, Akonolinga zone endémique de l'ulcère de Buruli et Mbalmayo en aval (campagne 1 : 4 échantillonnages ; campagne 2 : 6 échantillonnages pour chacun des trois sites). Des échantillonnages moins intenses ont été réalisés dans les autres sites dont Bankim (campagne 1 : 2 échantillonnages ; campagne 2 : 4 échantillonnages). Les sites d'Abong-Mbang, d'Akonolinga et de Mbalmayo sont régulièrement suivis dans le cadre du programme de lutte contre l'ulcère de Buruli dans lequel s'inscrivait notre propre recherche doctorale. Quatre échantillonnages au total, soit deux par campagne, ont été faits dans les autres sites non endémiques à l'ulcère de Buruli (Bamenda, Buéa, Garoua, Ngaoundéré, Santchou, Tibati).

Figure 1. Echantillonnage des punaises aquatiques directement en milieu aquatique (A) et par piège lumineux (B).

2. **Calcul des courbes de saturation en espèces de punaises aquatiques**

Nous avons évalué l'effort d'échantillonnage à différents niveaux d'agrégation des données (national, par grandes zones, par sites) en étudiant les courbes de saturation de recrutement d'espèces [16-18]. Il s'agit ici d'évaluer le rôle pris par les efforts d'échantillonnage réalisés dans chacun des 10 sites prospectés sur le recrutement d'espèces de punaises aquatiques, ce qui pourrait affecter les calculs ultérieurs de diversité biologique.

Dans un premier temps nous avons estimé l'effort d'échantillonnage à l'échelle nationale en incluant tous les sites retenus dans cette étude. Ensuite, les sites ont été regroupés en trois grandes zones (sud, ouest et nord) en fonction de leur positionnement biogéographique, et, enfin, les calculs ont été réalisés au niveau de chaque site d'échantillonnage. Le regroupement en grandes zones biogéographiques, soit trois, a été choisi car une étude par biomes (voir le chapitre 3) nous donnait des courbes peu informatives. Les graphes de saturation d'espèces ont été réalisés et visualisés en utilisant le package Vegan du logiciel R version 3.1.2 [19].

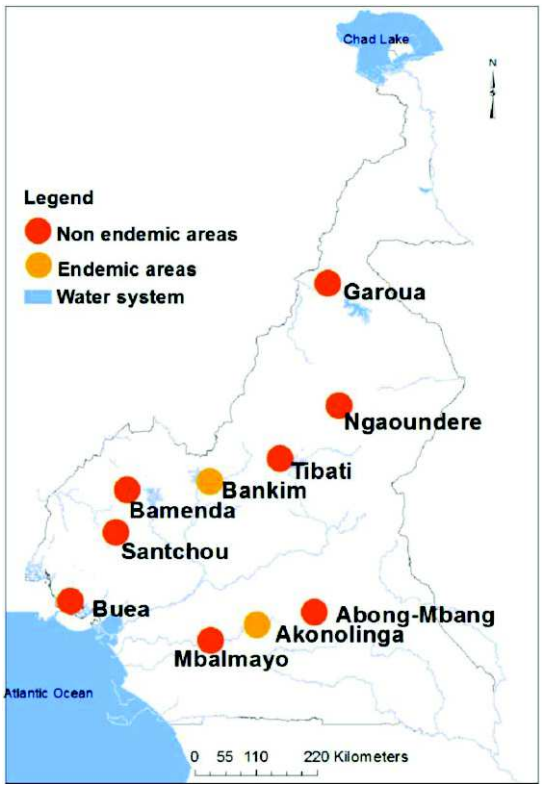


Figure 2. Sites d'échantillonnage des punaises aquatiques au Cameroun

3. Analyse des facteurs de biais d'échantillonnage sur les communautés de punaises aquatiques

Dans un souci d'une représentation géographique idéale des espèces de punaises aquatiques au Cameroun, nous avons opté pour des échantillonnages relativement bien distribués sur l'ensemble du territoire (Figure 2). Compte tenu de la distance de certains de ces sites par rapport à Yaoundé et de la difficulté d'accès pour d'autres (régions montagneuses, routes peu carrossables,…), nous n'avons pas pu fournir le même effort d'échantillonnage en termes de temps et de nombre d'échantillonnage réalisés. Cette différence dans les échantillonnages entre les sites peut induire un biais pour estimer et analyser la diversité biologique (richesse spécifique, différents indices de diversité) et la composition en espèces des communautés de punaises aquatiques. Pour ce faire, nous avons donc tenu compte des campagnes d'échantillonnage par site et de leur distance par rapport à Yaoundé dans des modèles linéaires généralisés, et ce afin de fixer ces deux paramètres (échantillonnage et distance) dans notre recherche de patrons macroécologiques potentiellement explicatifs des diversités en punaises aquatiques observées.

Dans un premier temps, nous avons considéré les répétitions d'échantillonnage réalisées pour les saisons pluviales et estivales dans le but de comparer un effet saisonnier dans nos estimations de richesse et de diversité biologique. Cette distinction ne s'étant pas avérée être informative, nous ne l'avons pas retenue dans nos analyses biostatistiques

ultérieures. De plus, en dehors des paramètres explicatifs propres, des termes d'interactions entre distance par rapport à Yaoundé × nombre d'échantillonnages ont été introduits dans les modèles linéaires généralisés. Les modèles linéaires généralisés généraux, où toutes les variables explicatives ont été conservées, ont été comparées avec les modèles minimaux. La multi-colinéarité possible entre variables explicatives a été gérée dans les modèles linéaires pas à pas (nous avons utilisé à la fois des méthodes descendantes dite backward et ascendantes/descendantes dite stepwise). Le coefficient d'Akaike (AIC) a été utilisé comme une mesure de la qualité de nos différents modèles possibles en pénalisant les modèles en fonction du nombre de paramètres et de leur explication dans la déviance générale. Autrement dit plus simplement, les modèles minimaux construits ont donc favorisé des solutions avec moins de variables mais informatives plutôt que présenter beaucoup de variables mais peu informatives, minimisant ainsi le risque de générer des modèles colinéaires. Les seuils de probabilité pour l'extraction ou l'ajout d'une variable explicative pas à pas ont été fixés à $p<0,05$. Des procédures similaires aux précédentes ont été utilisées pour des modèles généralisés logistiques afin de mettre en évidence dans un premier temps l'effet de l'effort d'échantillonnage et la distance par rapport à Yaoundé sur la présence (codée 1) et l'absence (codée 0) des espèces de punaises aquatiques dans les sites d'échantillonnage.

Dans un second temps, ces modèles ont pris en compte toutes les variables environnementales et géographiques comme variables explicatives afin de trouver un modèle minimal pouvant expliquer la présence/absence des espèces de punaises aquatiques dans les sites d'échantillonnage.

Les variables retenues pour expliquer la diversité biologique des communautés de punaises aquatiques au Cameroun sont les suivantes : les variables géographiques (longitude et latitude) ont été obtenues par des relevés GPS dans les différents sites alors que les distances kilométriques par rapport à Yaoundé, par rapport à Bankim, par rapport à la mer et par rapport à la forêt primaire ont été calculées à l'aide des informations disponibles sur le lien http://distancecalculator.globefeed.com/Cameroon_DistanceCalculator.asp. Les variables météorologiques tels que la température annuelle, la pluviométrie annuelle, la variabilité de température et de pluviométrie au cours d'une année ont été estiméesà partir du site http://www.worldclim.org/bioclim. Les estimations de paramètres ont été faites pour une zone de 5km de rayon autour de chaque localité (ANNOTXT) à l'aide des relevés des points GPS de chaque site d'échantillonnage.

4. Indicateurs de diversité biologique des communautés de punaises aquatiques

De nombreux indices actuellement utilisés en écologie permettent d'étudier la structure des communautés d'espèces animales ou végétales (des développements d'application se font de plus en plus sur les micro-organismes du microbiote) en faisant référence à un cadre spatiotemporel concret permettant ainsi d'avoir une évaluation de la diversité biologique. Parmi la trentaine d'indices différents, quatre indicateurs présentés ci-dessous [20] ont été retenus pour évaluer la diversité biologique des communautés de punaises aquatiques du Cameroun.

1) La richesse spécifique (S) qui correspond au nombre d'espèces d'une communauté recensées sur un site et à un moment donné [21] ;

2) L'indice de Shannon-Wiener (H') [22] qui permet de décrire de façon synoptique une communauté en tenant compte du nombre d'espèces qui le composent et de leur abondance relative ;

3) L'indice d'équitabilité (J') [23] ou Evenness (en anglais) qui permet d'estimer la régularité de la répartition des espèces au sein des relevés en évaluant la proportion des espèces dominantes et dominées. L'équitabilité a été calculée à partir de l'indice de Shannon (voir plus bas).

4) L'indice de Simpson (D) [24] qui mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce. Cet indice présente une valeur de 0 pour indiquer le maximum de diversité, et une valeur de 1 pour indiquer le minimum de diversité. Dans le but d'obtenir des valeurs « plus intuitives », on peut aussi préférer appliquer l'indice de diversité de Simpson représenté par 1-D, le maximum de diversité étant représenté par la valeur 1, et le minimum de diversité par la valeur 0.

Les indices de diversité intègrent l'analyse de la biodiversité en prenant mieux en compte la disparité entre espèces (espèces rares, espèces communes) à différents niveaux. Alors que la richesse spécifique intervient très souvent dans les efforts de gestion et de conservation de la biodiversité ainsi que dans l'évaluation de l'impact des activités anthropiques sur la biodiversité et notamment lorsque des espèces ont disparues par restrictions de leurs habitats naturels [21], l'équitabilité, quant à elle, est très utile pour comparer les dominances potentielles entre les espèces dans une communauté sans toutefois tenir compte de la richesse spécifique. Ce dernier indicateur varie de 0 à 1 ; il tend vers 0, quand la quasi-totalité des effectifs est concentrée sur une ou deux espèces (dominantes), elle est de l'ordre de 1 lorsque toutes les espèces ont la même abondance. Les deux autres indices de diversité biologique, Shannon et Simpson sont utilisés pour quantifier l'hétérogénéité de la diversité ; ils évaluent à la fois la richesse spécifique et l'équitabilité. Shannon varie de 0 à log de la richesse spécifique (logS), une valeur de H' égale à 0 signifie que tous les individus de la communauté appartiennent à une seule et même espèce, ou alors une espèce est largement dominante sur les autres ; une valeur de H' égale à logS signifie que toutes les espèces ont la même abondance (Frontier, 1983). Nous avons choisi de prendre en compte le $\log_2 S$ (logarithme base 2) originellement utilisé par Shannon comme unité d'information apportée dans le cas d'un événement ayant une chance sur deux de se produire « binary digit unit » et qui prend en compte les espèces rares. Quant à l'indice de Simpson, il varie de 0 à 1, et D prendra une valeur de 0 pour indiquer le maximum de diversité, et une valeur de 1 pour indiquer le minimum de diversité montrant donc une concentration des effectifs sur une ou deux espèces largement dominantes.

Les formules ayant permis de calculer ces indices de diversité biologique sont présentées ci-dessous.

Richesse spécifique :

Somme de toutes les espèces représentées en un site sur la période totale d'échantillonnage.

$$S = \sum_{i=0}^{n} ni$$

i : espèce i

n : nombre total d'espèces

Indice de Shannon :

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} p_i.\log 2 p_i$$

S : richesse spécifique

i : espèce étudiée

p_i : proportion d'une espèce i par rapport au nombre total d'individus de toutes les espèces

Equitabilité de Shannon

J' = H'/ log2(S)

H' : indice de Shannon

S : richesse spécifique

Indice de Simpson :

D = Σ Ni (Ni-1)/N (N-1)

Ni : nombre d'individus de l'espèce donnée

N : nombre total d'individus de toutes les espèces

Résultats

1. Estimation des courbes de saturation en espèces

La prospection de 10 sites au Cameroun nous a permis de recruter un total de 22 375 spécimens identifiés en 54 espèces de punaises aquatiques appartenant à 11 familles (Belostomatidae, Corixidae, Micronectidae, Gerridae, Hebridae, Hydrometridae, Mesoveliidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae et Veliidae) distribuées en deux infra-ordres (Nepomorpha et Gerromorpha) (voir les chapitres 1 et 2).

La richesse spécifique moyenne pour l'ensemble des échantillonnages est de 25,15 (écart type ±7,36) et l'effort d'échantillonnage estimé à l'échelle nationale est illustré par la courbe de saturation présentée sur la Figure 3. Celle-ci indique un recrutement croissant de nouvelles espèces qui atteint une saturation en espèces entre 8 et 10 échantillonnages et au-delà desquels, la courbe tend vers un plateau. Ce recrutement est loin de couvrir la totalité des espèces de

punaises aquatiques précédemment signalées du Cemeroun par Raymond Poisson (1929, 1937, 1941, 1948, 1965a, 1965b, 1966 ; Linnavouari 1981; Andersen 1975; Medler 1980 voir chapitre 2.

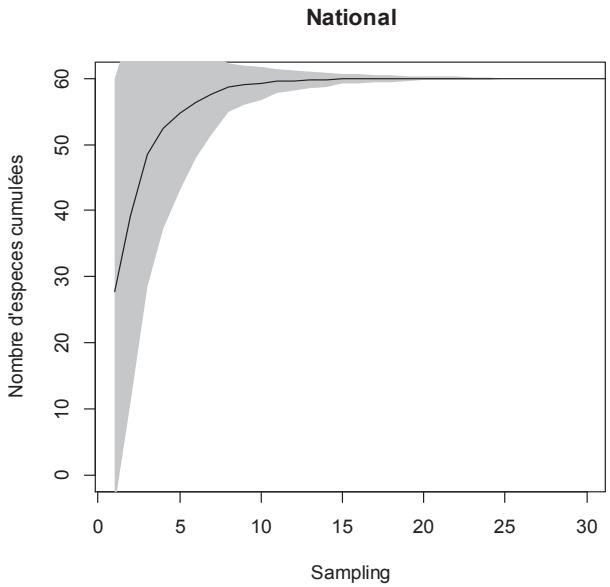


Figure 3. Courbe de saturation en espèces au niveau national.

La ligne en trait plein correspond au nombre moyen d'espèces selon l'effort d'échantillonnage réalisé et la zone grisée l'intervalle de confiance obtenu à partir d'un tri aléatoire des échantillonnages utilisant un ré-échantillonnage sans remise.

Les zones Sud, Nord et Ouest délimitées dans cette étude ont respectivement un nombre d'échantillonnages total et une richesse spécifique moyenne de (30 ; 27,80 espèces, écart type ±6), (18 ; 24,77 espèces, écart type ±7,5) et (12 ; 19,08 espèces, écart type ±7). Les courbes de saturation obtenues indiquent un recrutement de 50% de la richesse spécifique totale après 10 échantillonnages dans la zone Sud, 20% dans la zone Nord après 5 échantillonnages et 16% dans la zone Ouest après 3 échantillonnages (Figure 4). Ainsi, plus l'effort d'échantillonnage est élevé et plus la chance de recruter de nouvelles espèces augmente (Figure 4), et il apparaît donc qu'en regroupant nos données en trois zones, nous ayions à cette échelle spatiale, recruté le maximum d'espèces possibles pour ces trois grandes zones.

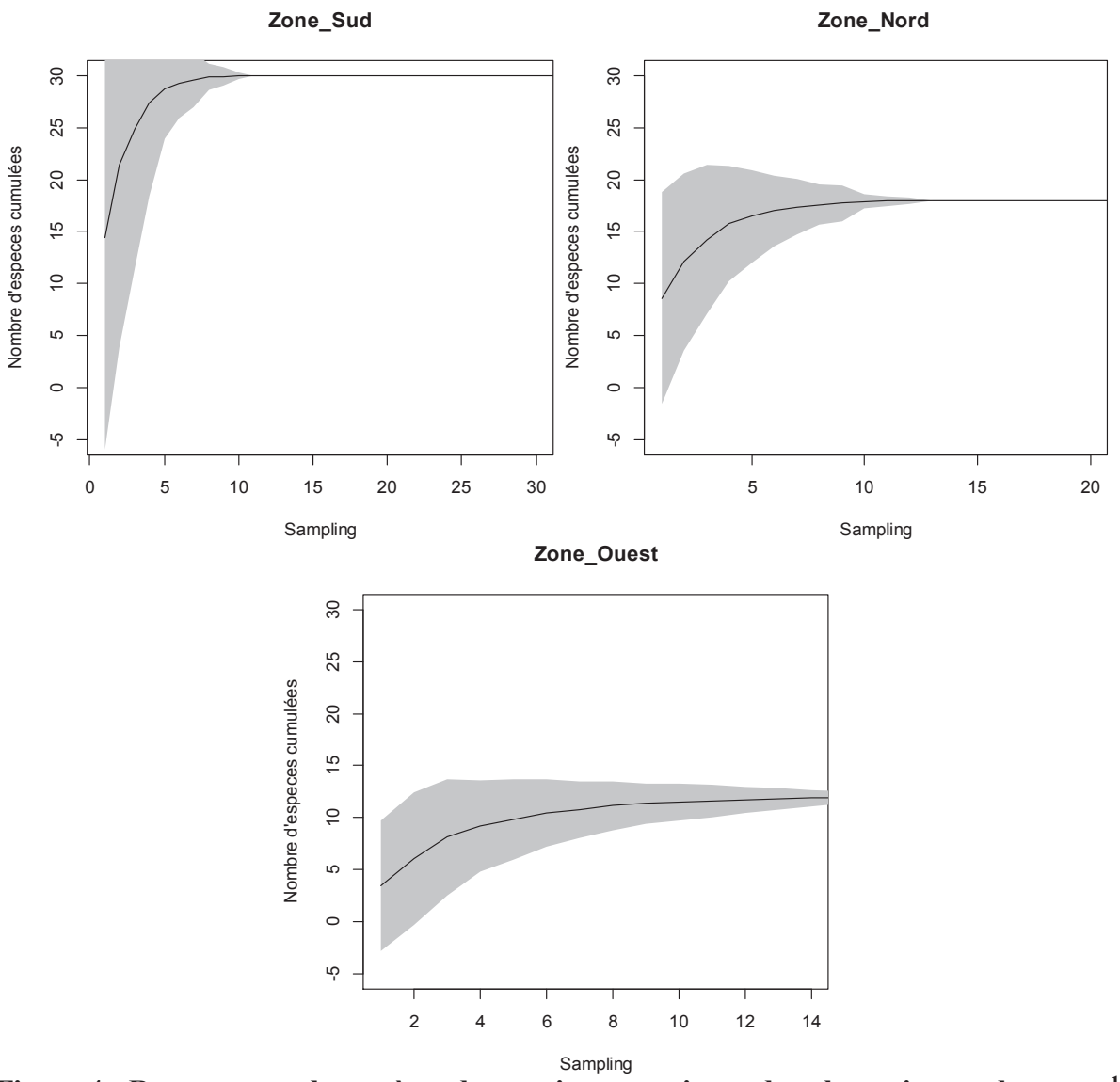


Figure 4 : Recrutement des espèces de punaises aquatiques dans les trois grandes zones[1] délimitées dans cette étude

Les trois zones ont été définies en fonction de la disposition géographique des sites d'échantillonnage.

Enfin, nous avons évalué la qualité en termes de recrutement d'espèces de nos échantillonnages pour les différents sites d'échantillonnage, soit 10 sites. Les courbes de saturation obtenues sont ici volontairement classées en deux catégories : une première catégorie regroupe les sites où le recrutement atteint une saturation en espèces de punaises (Figure 5) ; la seconde, quant à elle, associe les sites où le recrutement n'atteint pas une telle saturation (Figure 6). Si l'effort d'échantillonnage fourni pour les quatre sites d'Abong-Mbang, Akonolinga, Mbalmayo et Bankim est très acceptable en termes de qualité de recrutement, les sites de la seconde catégorie, soit Buéa, Bamenda, Garoua, Ngaoudéré, Santchou et Tibati montrent un recrutement d'espèces non achevé qui se traduit sur les sous-figures correspondantes à une absence de plateau (Figure 6).

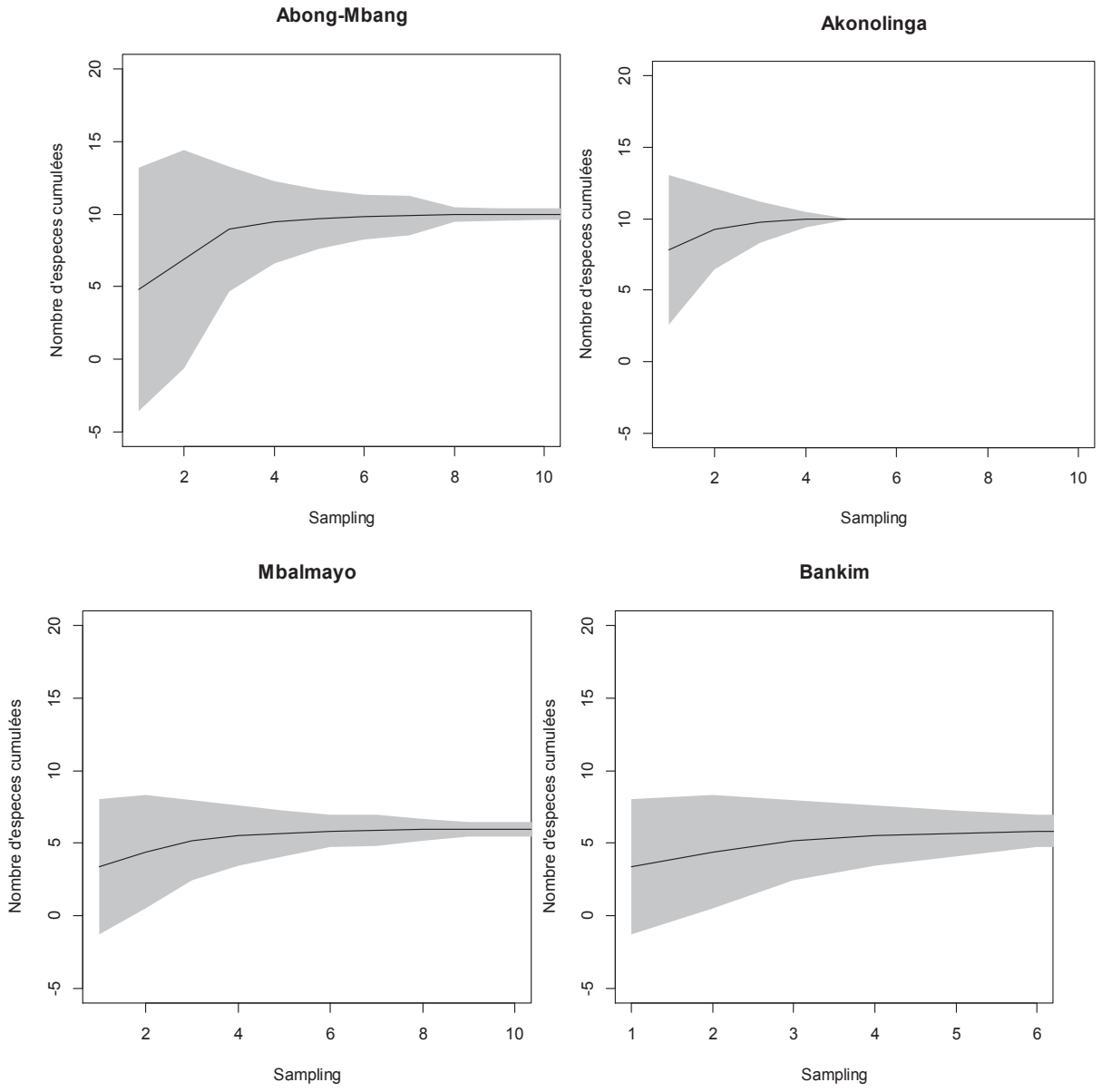


Figure 5. Recrutement des espèces de punaises aquatiques dans les sites d'échantillonnage où le recrutement atteint une saturation

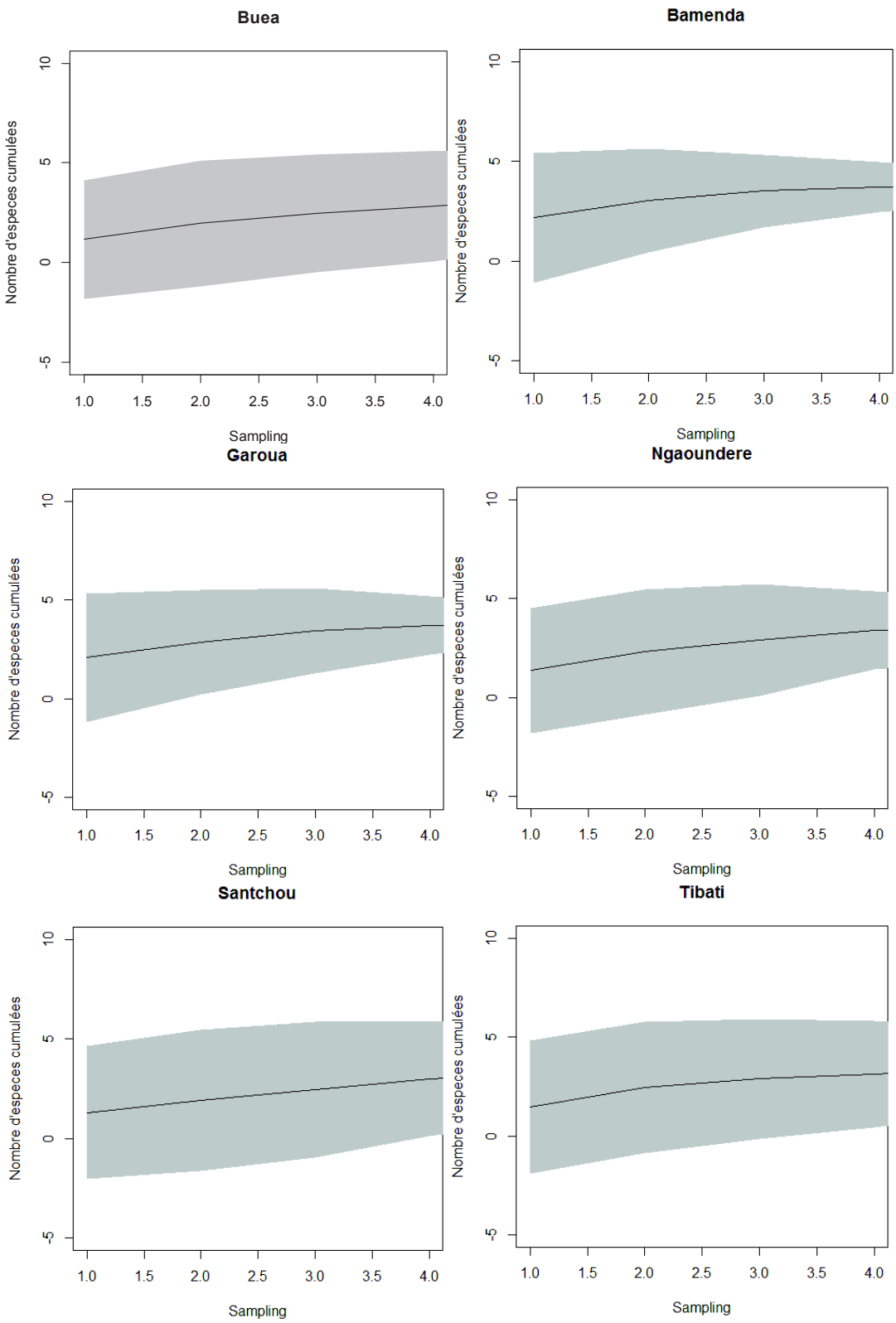

Buea
Bamenda
Garoua
Ngaoundere
Santchou
Tibati
Nombre d'especes cumulées
Sampling
10
5
0
-5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0

Figure 6. Recrutement des espèces de punaises aquatiques dans les sites d'échantillonnage où le recrutement n'atteint pas la saturation.

2. Analyse du biais d'échantillonnage et de la distance par rapport à Yaoundé sur les calculs de richesse spécifique et de diversité biologique en punaises aquatiques

Alors que la richesse spécifique donne une quantité soit la somme des espèces présentes sans apporter d'information sur la qualité de ces espèces et la composition de celles-ci, les indices de diversité déterminent la façon dont la diversité est repartie dans un milieu donné (Evenness de Shannon) et quantifient l'hétérogénéité ainsi que l'équitabilité de cette diversité (en utilisant les indices de Shannon-Wiever et de Simpson). L'analyse biostatistique avec tour à tour la richesse spécifique, l'indice de Simpson, l'indice de Shannon-Wiever et l'équitabilité, calculés pour chacun des 10 sites, et mis comme variable à expliquer en fonction du nombre d'échantillonnage réalisé, de la distance de chacun des sites par rapport à Yaoundé ainsi que le terme d'interaction échantillonnage × distance par rapport à Yaoundé, montre un fort effet de la quantité d'échantillonnages par site sur le calcul des richesses spécifiques (ce qui est conforme aux résultats précédents concernant les courbes de saturation) ainsi que sur ceux des indices de diversité biologique (et pour cause car l'un ou l'autre prend en compte la richesse spécifique ou l'abondance totale).

Dans une première catégorie de sites constituée d'Abong-Mbang, d'Akonolinga, de Mbalmayo et de Bankim, nous avons obtenu des valeurs plus élevées de richesse spécifique et d'indice de Simpson. Les indices de Shannon et d'équitabilité sont, en revanche, les plus faibles dans ces sites (voir Tableau 1). Bien que les valeurs de l'indice de Simpson soient les plus élevées ici, elles restent cependant très proches de 0 traduisant ainsi un maximum de diversité spécifique dans ces sites. Les indices de Shannon et d'équitabilité, lesquels traduisent une répartition des individus concentrée sur un petit nombre d'espèces, mettent en évidence la présence d'espèces rares dans ces quatre sites.

Dans la deuxième catégorie, constituée des six sites qui sont Bamenda, Buéa, Garoua, Ngaoundéré, Santchou et Tibati, les valeurs prises par les indices de Shannon-Wiever et d'équitabilité sont eux plus élevées. La richesse spécifique y est la plus faible à l'exception de Garoua ; de même l'indice de Simpson est également le plus faible à Garoua (Tableau1). Les indices de Shannon-Wiever et d'équitabilité élevés pour ces six sites traduisent une répartition quasi-équitable des effectifs au sein des espèces existantes dans les différents sites. Cependant, les valeurs de l'indice de Simpson très proches de 0 notamment à Garoua où cette valeur est la plus faible (0,06) témoignent de la présence d'espèces rares et donc d'une hétérogénéité spécifique dans ces sites (Tableau 1). Le biais d'échantillonnage causé par l'éloignement de certains sites tel que Garoua impacte considérablement sur l'évaluation de leur diversité biologique. Ainsi, l'effort d'échantillonnage maximal (6-10 échantillonnages par site) effectué à Akonolinga, AbongMbang, Mbalmayo et Bankim correspondant aux sites les plus proches de Yaoundé a permis d'estimer plus aisément la diversité biologique dans ces sites. A la suite des prospections multiples dans ces sites, la quasi-totalité des espèces de punaises aquatiques y existant a été récoltée, d'où les richesses spécifiques les plus élevées obtenues ici. Ceci est confirmé par les indices de Shannon et d'équitabilité plus bas traduisant de l'hétérogénéité dans ces sites (Figure 7). Ce qui n'est pas le cas avec la deuxième catégorie de sites constituée de Bamenda, Buéa, Garoua, Ngaoundéré, Santchou et Tibati généralement situés à plus de 400 km de Yaoundé où l'on a effectué seulement 4 prospections et où les richesses spécifiques les

plus basses sont enregistrées sauf à Garoua (Figure 7). Les indices de Shannon et d'équitabilité les plus faibles observés dans la première catégorie traduisent une grande hétérogénéité contrairement à la deuxième catégorie où ces indices sont plus élevés témoignant ainsi d'une distribution quasiéquitable des effectifs au sein des espèces. L'indice de Simpson le plus faible est enregistré dans les deux sites (Ngaoundéré et Garoua) les plus éloignés de Yaoundé traduisant la présence d'espèces rares (Figure 7).

Tableau 1 - Indicateurs de diversité biologique pour les 10 sites échantillonnés au Cameroun

Sites	Richesse spécifique	Shannon	Equitabilité	Simpson
Abong-Mbang	37	3,25	0,62	0,25
Akonolinga	39	3,42	0,65	0,17
Bamenda	36	3,79	0,73	0,13
Bankim	39	3,78	0,72	0,14
Buéa	22	3,77	0,84	0,10
Garoua	42	4,57	0,85	0,06
Mbalmayo	44	3,92	0,72	0,16
Ngaoundéré	31	3,95	0,80	0,09
Santchou	22	3,46	0,78	0,15
Tibati	26	3,67	0,78	0,11

3. Etude de la variation de la richesse spécifique et des indices de diversité biologique des communautés de punaises aquatiques du Cameroun

L'estimation de la richesse spécifique et des indices de diversité biologique permet de caractériser les communautés d'organismes vivants en un lieu et à un moment donné. Les communautés de punaises aquatiques du Cameroun ont été caractérisées par le calcul de la richesse spécifique et d'indices diversité dans les différents sites d'échantillonnage retenus pour cette étude. Ainsi, la richesse spécifique enregistrée dans ces sites oscille entre 22 et 44 espèces. Les richesses spécifiques les plus élevées (44 écart type = ± 0,414 et 42 écart type = ±0,436 espèces) sont observées respectivement à Mbalmayo et Garoua suivis de Bankim et Akonolinga où la richesse spécifique est de 39 espèces écart type = ±0,463, d'Abong-Mbang et de Bamenda où l'on a recruté tour à tour 37 écart type = ±0,483 et 36 écart type = 0,483 espèces. La richesse spécifique la plus faible (22 espèces écart type = ±0,492) est observée à Buéa et Santchou qui sont précédés de Ngaoundéré (31 espèces écart type = ±0,501) et Tibati (26 espèces écart type = ± 0,502). Dans l'ensemble des sites d'échantillonnage, l'indice de Simpson reste très proche de 0. Selon sa définition, cet indice est la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard dans un milieu donné soient de la même espèce. De plus, cet indice ne prend en compte que des espèces abondantes. Ces valeurs proches de 0 traduisent une probabilité élevée que les individus choisis au hasard appartiennent à des espèces

différentes et par conséquent une grande diversité spécifique. L'indice de Shannon basé sur l'abondance relative des espèces et le logS prend en compte les espèces rares. Les valeurs de Shannon obtenues (entre 3,25 et 4,57) tendent vers le logS dans l'ensemble des sites qui est de 5,80. Ceci témoigne de la répartition des effectifs dans un petit nombre d'espèces et la présence des espèces rares dans ces sites. De la même manière, l'équitabilité dont les valeurs tendent vers 1 oscillent entre 0,62 et 0,85, ce qui confirme la concentration des effectifs au sein d'un nombre limité d'espèces ; et par conséquent une répartition des communautés de punaises aquatiques à se faire de manière déséquilibrée dans l'ensemble des sites. Les valeurs de la richesse spécifique et des indices de diversité biologique obtenues dans cette étude sont consignées dans le Tableau 1 et leur répartition dans les différents sites d'échantillonnage est illustrée par la Figure 8.

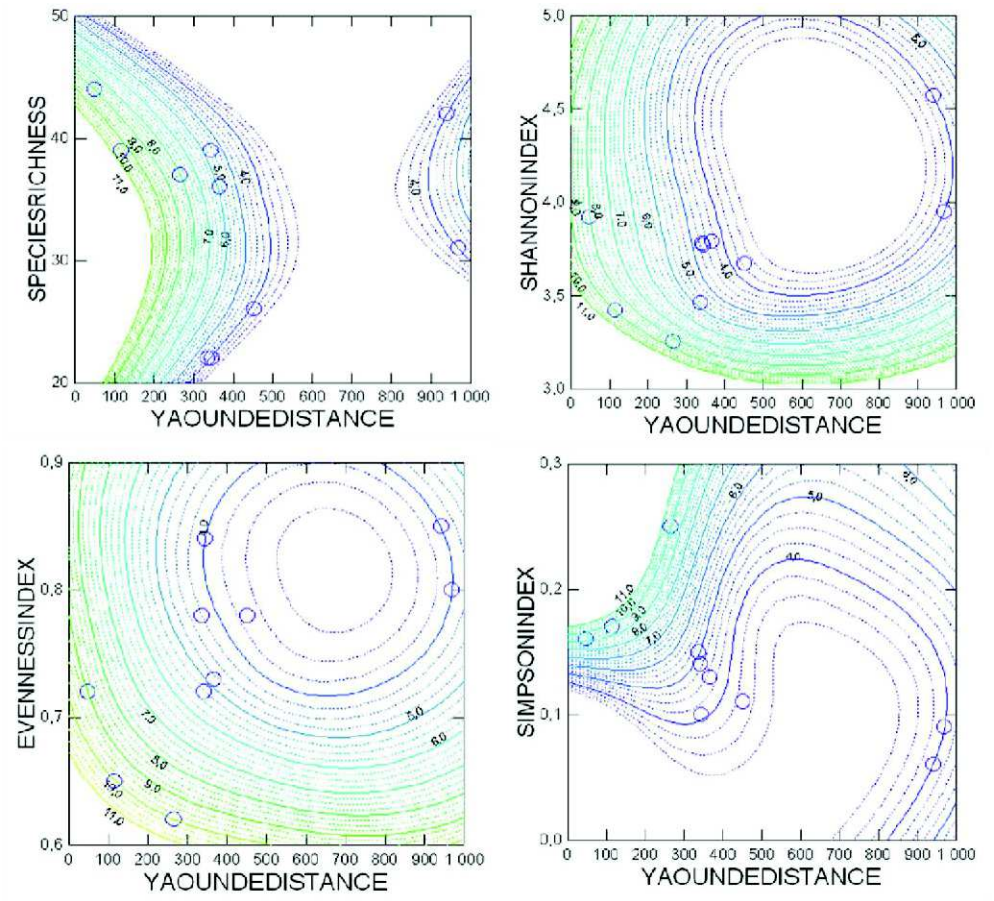


Figure 7. Effet de la distance kilométrique par rapport à Yaoundé, pour chacun des sites échantillons sur les estimations de richesse spécifique, de valeur des indices de ShannonWiever, d'équitabilité et de Simpson.

4. **Comment peut-on expliquer la diversité biologique des communautés de punaises aquatiques en fonction des paramètres environnementaux ?**

4.1. Cas de la distance kilométrique par rapport à Yaoundé et de l'effort d'échantillonnage

Les modèles linéaires généralisés intégrant l'effort d'échantillonnage, la distance kilométrique par rapport à Yaoundé et les termes d'interaction entre ces deux variables ont permis de montrer comment la richesse spécifique et les indices de diversité biologique évoluent entre les sites d'échantillonnage. Ainsi, le nombre total d'échantillonnage par site retenu pour expliquer la richesse spécifique, l'équitabilité de Shannon et l'indice de Simpson s'avère statistiquement significatif pour l'équitabilité de Shannon avec un coefficient de détermination R^2 = 0,739 p = 0,001et pour l'indice de Simpson dont R^2 = 0,640 p = 0,005. Cependant, cette variable est statistiquement non significative pour expliquer la richesse spécifique en punaises aquatiques car R^2 = 0,328 pour p = 0,084 (Tableau 2). L'indice de Shannon quant à lui est expliqué de façon statistiquement significative par la variable distance par rapport à Yaoundé (voir Tableau 2). L'équitabilité est corrélée négativement avec l'effort d'échantillonnage (coefficient de régression = -0,024, p = 0,001) car plus le nombre total d'échantillonnage est élevé, plus la chance de récolter les espèces rares est élevée conduisant ainsi à une répartition inéquitable des effectifs au sein des espèces. Par contre, l'effort d'échantillonnage est corrélé positivement avec l'indice de Simpson (coefficient de régression = 0,016, p = 0,005). Une corrélation positive est également notée entre l'indice de Shannon et la distance par rapport à Yaoundé (coefficient de régression = 0,001, p = 0,037) (voir Tableau 2).

Tableau 2 -Modèle minimal retenu à partir du modèle linéaire généralisé pour expliquer la richesse spécifique et les indices de diversité biologique des punaises aquatiques.

Variables à expliquer	Variables explicatives retenues	R-Square	Coeff régression	Standard Error	Std. Coefficient	P-value	AIC
RS	Echant total	0,328	1,723	0,872	0,573	0,084	71,142
H'	Dist Yaoundé	0,439	0,001	0	0,663	0,037	7,336
J'	Echant total	0,739	-0,024	0,005	-0,859	0,001	-31,726
D	Echant total	0,64	0,016	0,004	0,8	0,005	-35,825

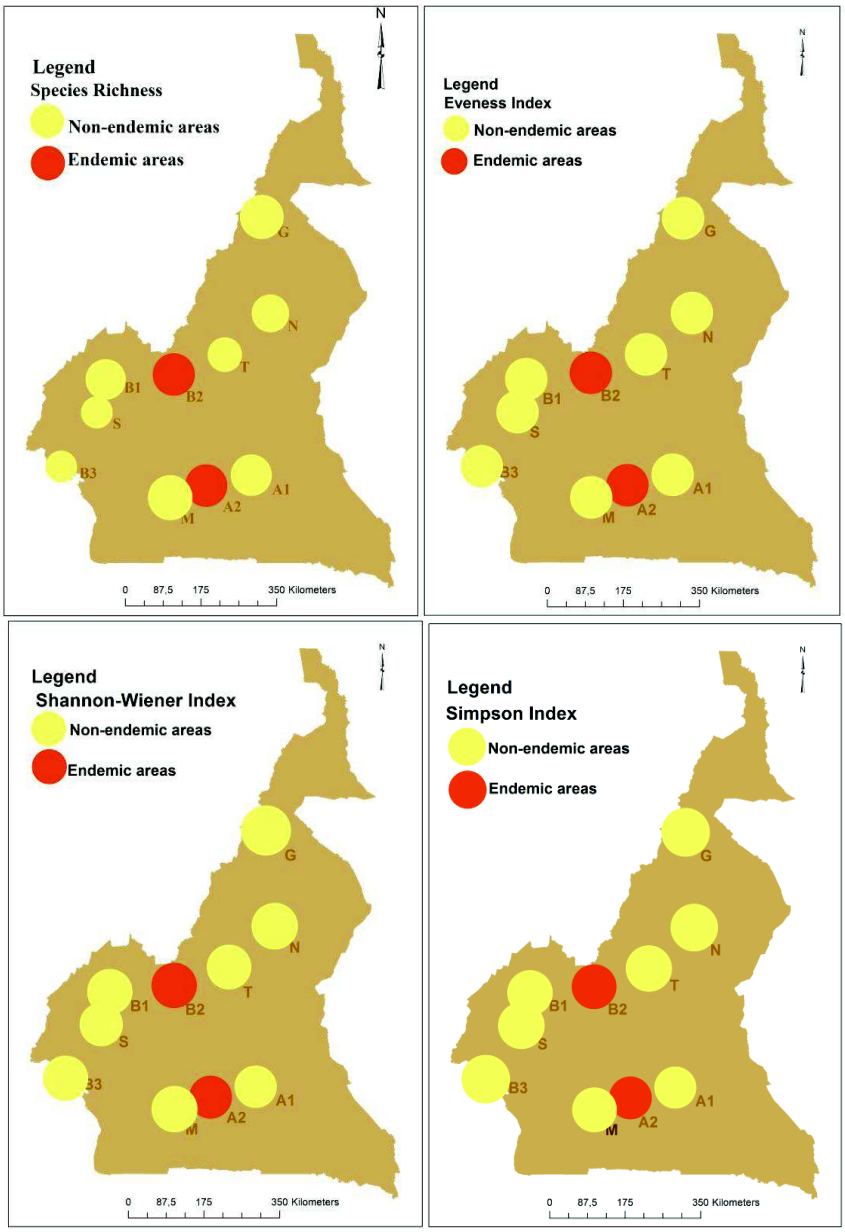


Fig. 8 : Cartographie de la distribution de la richesse spécifique et des indices de diversité biologiques au sein des sites d'échantillonnage
(Abong-Mbang = A1, Akonolinga = A2, Bamenda = B1, Bamenda = B1, Bankim = B2, Buéa = B3, Garoua = G, Mbalmayo = M, Ngaonudéré = N, Santchou = S, Tibati = T)

4.2. Quels autres variables environnementales peuvent expliquer la richesse spécifique et les indices de diversité biologique des punaises aquatiques du Cameroun ?

Les modèles généralisés généraux prenant en compte l'ensemble des autres variables explicatives biogéographiques, météorologiques, retenues pour cette étude a permis de mettre en évidence celles qui peuvent expliquer la richesse spécifique et les indices de diversité biologique des punaises aquatiques du Cameroun en dehors du biais d'échantillonnage et de la distance par rapport à Yaoundé (voir point 4.1 précédent). À la suite d'une procédure stepwise

et grâce aux critères de sélection d'AIC un modèle minimal explicatif a été retenu. Ainsi, la richesse spécifique est expliquée par un modèle minimal constitué de : l'échantillonnage total (imposé dans le modèle), la longitude et la variabilité annuelle de la pluviométrie pour un coefficient de détermination multiple R^2 de 0,77 et des valeurs des coefficients de corrélation respectives (0,327, p= 0,66); (-5,665, p= 0,08) ; et (-0,019, p= 0,02). Statistiquement, seule la variabilité annuelle de la pluviométrie est corrélée de manière significative et ici négativement à la richesse spécifique (Tableau 3).

Le modèle minimal retenu pour expliquer l'indice de Shannon est constitué de la distance par rapport à Yaoundé (imposé dans le modèle) et de la distance par rapport à la forêt avec un coefficient de détermination multiple R^2 de 0,69. Mais ce modèle apparaît être statistiquement non significatif. De plus, la corrélation entre l'indice de Shannon et la distance par rapport à Yaoundé est nulle (coefficient de régression = 0,000) et celle entre l'indice de Shannon et la distance par rapport à la forêt est très faible (coefficient de régression = 0,003).

L'équitabilité est expliquée par un modèle minimal constitué de l'échantillonnage total (imposé dans le modèle) et la distance par rapport à Bankim avec un coefficient de détermination multiple R^2 égal à 0,88 (Tableau 3). L'équitabilité est corrélée négativement avec l'échantillonnage total avec une valeur du coefficient de régression égale à -0,026 et p = 0,0001 alors que la corrélation entre l'équitabilté et la distance par rapport à Bankim est nulle (Tableau 3).

L'indice de Simpson est expliqué par l'échantillonnage total (imposé dans le modèle) et la pluviométrie annuelle avec un coefficient de détermination multiple R^2 de 0,83. Une corrélation positive (coefficient de régression = 0,017, p=0,001) est observée entre l'indice de Simpson et l'échantillonnage total alors que cette corrélation est nulle entre l'indice de Shannon et la pluviométrie annuelle (Tableau 3).

Tableau 3. Modèle minimal retenu à partir du modèle linéaire généralisé général pour expliquer la richesse spécifique et les indices de diversité biologique en punaises aquatiques.

Variables à modèle minimal expliquer	retenu	Coef Standard regression	Std. Error	Coefficient	P-value	Squared Multiple R	AIC
S	Echant total	0,327	0,714	0,109	0,663	0,773	64,3
	Longitude	-5,665	2,690	-1,079	0,080		
	Var pluviométrie	-0,019	0,006	-1,662	0,024		
H'	Dist Yaoundé	0,000	0,000	-0,083	0,834	0,688	3,473
	Dist Forêt	0,003	0,001	0,897	0,05		
J'	Echant total	-0,026	0,004	-0,915	0,000	0,875	-37,135
	Dist Bankim	0,000	0,000	0,374	0,028		
D	Echant total	0,017	0,003	0,872	0,001	0,834	-41,566
	Pluvio annuelle	0,000	0,000	0,446	0,024		

5. Comment peut-on expliquer la présence/absence des espèces de punaises aquatiques en fonction des paramètres environnementaux (biogéographique) ?

Comme nous disposons de 54 espèces de punaises, et ne pouvant pas développer des modèles logistiques pour chacune d'entre elles, nous avons fait le choix de prendre trois groupes d'espèces, chaque groupe présentant 3 à 4 espèces représentatives : un premier groupe montrant autant de sites où l'espèce est présente qu'absente (Laccotrephes calcaratus, Laccotrephes_fabricii, Ranatra_Capensis_congoensis) ; un deuxième groupe où les espèces sont en majorité très présentes entre les sites (Limnogonus (Limnogoides) intermidius, Mesovellia_vigittigera, Angelia_sp) ; enfin, un troisième groupe où les espèces sont en majorité absentes entre les sites (Hydrocyrius nanus, Limnogeton fieberi, Laccocoris discus). Tous les modèles logistiques développés pour expliquer la présence (codée 1) et l'absence (codée 0) des différentes espèces de punaises aquatiques retenues ont échoué à trouver une ou des variables explicatives. Cependant, il s'avère que la variable "variabilité de la pluviométrie" apparait dans les étapes d'introduction/retrait de variables être retenue puis retirée, et au final n'est pas retenue notamment pour expliquer la présence/absence de certaines espèces de punaises. La Figure 9A montre par exemple que la variabilité annuelle de pluviométrie discrimine relativement bien entre les sites où l'espèce Mesovellia vigittigera est absente (plus forte variabilité intra-annuelle de pluies) et les sites où cette espèce est présente (plus faible variabilité intra-annuelle de pluies). La présence de cette espèce semble ainsi associée aux écarts de pluviométrie moyens à faibles de l'année, ce qui pourrait correspondre à une niche écologique où l'espèce exige une pluviométrie moyenne régulière ou des conditions aquatiques permanentes. Les mêmes observations peuvent être faites concernant l'espèce Angilia sp. (Figure 9B) même si la discrimination entre présence et absence de l'espèce en fonction de la variabilité de pluviométrie annuelle est ici moins avérée. Le fait que la variable « Variabilité intra-annuelle de pluviométrie » ne soit pas retenue dans les modèles logistiques s'explique très simplement par le faible degré de liberté dans nos analyses (10 sites). Quoi qu'il en soit cette variable pourrait être une variable très importante pour expliquer la distribution de certaines espèces de punaises aquatiques très inféodées à des systèmes aquatiques pérennes. Nous donnons en annexes les résultats issus des modèles logistiques pour les différentes espèces de punaises aquatiques étudiées (voir Annexe 1).

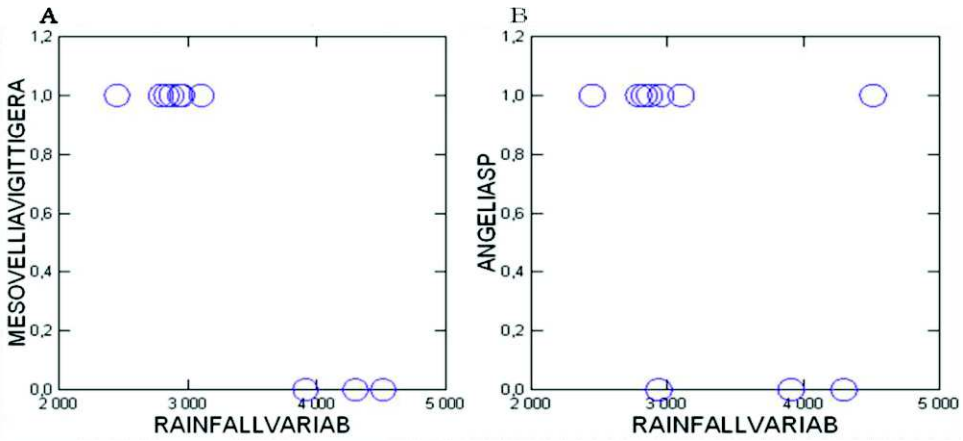


Figure 9. Illustration de l'effet de la variabilité annuelle de la pluviométrie (Rainfallvariab) sur la présence/absence de (A) Mesovellia vitigera et (B) Angelia sp.

On note un chevauchement important pour Angelia sp. des sites où l'espèce est présente ou absente en fonction du paramètre Variabilité annuelle de la pluviométrie.

Discussion

L'étude de la diversité biologique des communautés de punaises aquatiques révèle une différence de leur composition et leur structure suivant la distance par rapport à Yaoundé et l'effort d'échantillonnage fourni pour le recrutement des espèces dans les différents sites d'échantillonnage. Outre la grande distance kilométrique entre Yaoundé et certains sites d'échantillonnage à l'origine du biais d'échantillonnage, sa localisation en zone de forêt dense équatoriale offre aux sites d'échantillonnage avoisinants (Abong-Mbang, Akonolinga, Mbalmayo) des conditions particulières. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de Yaoundé, on note une dégradation de cette forêt qui pourrait ainsi être un facteur de détermination des patrons de distribution des espèces de punaises aquatiques au Cameroun. Des espèces rares telles que Limnogeton fieberi, Laccotrephes sp., Anisops (Anisops) jaczewskii et Anisops sp. ont été recrutées uniquement à Garoua situé en zone soudano-sahélienne classé deuxième en terme de richesse spécifique malgré un effort d'échantillonnage insuffisant fourni dans ce site. Bankim, situé dans une zone de transition forêt savane présente la même richesse spécifique que Akonolinga (Tableau 1) bien que la composition en espèces ne soit pas la même (voir tableau annexe 2). De plus, les indices de diversité biologique ont des valeurs quasi-identiques dans ces deux sites d'échantillonnage (Tableau 1). Cependant, l'effort d'échantillonnage n'est pas le même à Akonolinga (10 échantillonnages au total) et Bankim (6 échantillonnages au total). L'échantillonnage total étant la variable retenue par les modèles généralisés pour expliquer la richesse spécifique, un effort d'échantillonnage plus robuste pourrait conduire à un recrutement de nouvelles espèces à Bankim (le plateau de saturation n'étant pas très net Fig. 5) et pourrait ainsi traduire une forte diversité d'espèces de punaises aquatiques dans ce site.

Cette étude a permis d'avoir une vue générale de la structure et la composition des communautés de punaises aquatiques au Cameroun. Cependant, une étude approfondie de la macroécologie sur un grand nombre de sites bien connus et un effort d'échantillonnage robuste sont nécessaires pour estimer avec plus de précision la diversité biologique de ces insectes au Cameroun.

Références

1. SCBD SotCoBD (2003) Interlinkages between Biologycal Diversity and Climate Change. Rapport.

2. Brown JH (1995) Macroecology. The University of Chicago Press, : 1-270.

3. Gaston KJ, Blackburn TM (1998) Pattern and Process in Macroecology. Blackwell: 1-392.

4. Crisci JT, Katinas L, Posadas P (2005) Historical Biogeography:. Systematic Biology 54: 338340.

5. Polhemus JT, Polhemus DA (2007) Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. . Hydrobiologia 595: 379 - 391.

6. Poisson R (1929) Contribution à la faune du Cameroun Hémiptères aquatiques. Faune Colon Fr 3: 135–164.

7. Poisson R (1937) Voyage de M. P.-P. Grassé en Afrique Occidentale Francaise. Hemiptera aquatica. Ann Soc Entomol Fr 106: 115–132.

8. Poisson R (1948a) Hydrocorises du Cameroun. Mission J. Carayon 1947. Rev Fr Entomol 3: 167–177.

9. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne P-A, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection The Lancet 353: 986.

10. Marsollier L, Robert R, Aubry J, André J-PS, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic Insects as a Vector for Mycobacterium ulcerans Applied and Environmental Microbiology 68: 46234628.

11. Ebong SMA, Eyangoh S, Marion E, Landier J, Marsollier L, et al. (2012) Survey of water bugs in Bankim, a new Buruli ulcer endemic area in Cameroon. . Journal of Tropical Medicine: 1-8.

12. Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, et al. (2010) Seasonal and Regional Dynamics of M. ulcerans Transmission in Environmental Context: Deciphering the Role of Water Bugs as Hosts and Vectors. PLoS Negleted Tropical Deseases 4: 1-10.

13. Marion E, Landier J, Boisier P, Marsollier L, Fontanet A, et al. (2011) Geographic Expansion of Buruli Ulcer Disease, Cameroon. Emerg Infect Dis 17: 551–553.

14. Duviard D (1979) Flight Activity of Belostomatidae in Central Ivory Coast. Oecologia 16: 321 - 328.

15. lansbury I (1960) Corixidae (Hem. - Het.) at light. The Entomologist 93: 212-213.
16. Colwell RK, Coddinton JA (1994) Estimating terrestial Biodiversity through extrapolation. Biological Sciences 345: 1001-1118.

17. Colwell RK, Mao CX, Chang J (2004) Iterpolating, extrapolating and comparing incidencebased accumulation curves. Ecology 85: 2717-2727.

18. Gotelli NJ, Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. Ecology Letters 4: 379-391.

19. CoreTeam R (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

20. Magurran AE (2004) Measuring Biological Diversity. Blackwell Science Ltd: 1-.

21. Nicholas JD, Boulinier T, Hines JE, Pollock KH, Sauer JR (1998) Inference methods for spatial variation in species richness and community composition when not all species are detected. . Conservation Biology 12: 1390-1398.

22. Shannon CE, Weaver W (1963) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press.

23. Pielou EC (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. Theoretical Biology 13: 131-144.

24. Simpson EH (1949) « Measurement of diversity ». Nature 163.4148: 688.

Annexe1 : Le score statistique présenté dans ces tableaux se rapporte à l'effet du test et non aux modèles généralisés logistiques.

Annexe 1A : groupe1 montrant autant de sites où les espèces sont présentes qu'absentes

	Laccotrephes calcaratus		*Laccotrephes fabricii*		*Ranatra capensis congoensis*	
Variables	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**
Echant total	1,211	0,271	0,164	0,685	0,905	0,341
Dist Yaoundé	2,63	0,105	0,216	0,642	3,708	0,054
Echant total*Dist Yaoundé	0,033	0,855	0,022	0,881	0,068	0,794
Longitude	1,316	0,251	0,107	0,744	0,462	0,497
Latitude	0,038	0,845	0,127	0,722	0,001	0,972
Dist Bankim	1,717	0,19	0,196	0,658	0,006	0,939
Dist Océan	0,056	0,812	0,011	0,917	0,197	0,657
Dist Forêt	1,039	0,308	0,038	0,845	0,038	0,845
Annualtemp	0,332	0,564	1,818	0,178	2,267	0,132
Annualrainf	0,266	0,606	0,437	0,509	0,848	0,357
Tempvariab	0,448	0,503	0,006	0,941	0,025	0,875
Rainfallvariab	1,812	0,178	0,016	0,899	2,488	0,115
Log-Likelihood	-6,73		-6,73		-6,73	
AIC	15,46		15,46		15,46	

Annexe 1B : groupe où les espèces sont en majorité très présentes entre les sites

	Limonogonus L. intermidus		*Mesovelia vigittigera*		*Angilia* sp	
Variables	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**
Echant total	1,484	0,223	0,242	0,623	0,057	0,811
Dist Yaoundé	1,391	0,238	2,384	0,123	0,787	0,375
Echant total*Dist Yaoundé	0,732	0,392	1,355	0,244	2,384	0,123
Longitude	0,21	0,647	7,664	0,006	1,351	0,245
Latitude	0,559	0,455	0,563	0,453	0,048	0,826
Dist Bankim	3,637	0,057	0,046	0,831	2,185	0,139
Dist Océan	0,18	0,671	3,787	0,052	0,243	0,622
Dist Forêt	3,239	0,072	1,044	0,307	0,562	0,454
Annualtemp	0,013	0,911	3,796	0,051	0,311	0,577
Annualrainf	2,231	0,135	5,244	0,022	0,037	0,848
Tempvariab	0,614	0,433	1,574	0,21	1,926	0,165
Rainfallvariab	0,257	0,612	9,036	0,003	4,64	0,031
Log-Likelihood	-5,004		-6,109		-6,109	
AIC	12,008		14,217		14,217	

Annexe 1 C : groupe où les espèces sont en majorité absentes entre les sites

	Hydrocyrius nanus		*Limnogeton fieberi*		*Laccocoris discus*	
Variables	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**	**Score Statistic**	**Chi-Square Significance**
Echant total	1,004	0,316	0,173	0,678	1,626	0,202
Dist Yaoundé	0,87	0,351	0,139	0,71	1,391	0,238
Echant total*Dist Yaoundé	0,702	0,402	0,025	0,874	0,842	0,359
Longitude	0,591	0,442	0,591	0,442	0,002	0,968
Latitude	0,195	0,659	0,195	0,659	2,598	0,107
Dist Bankim	2,379	0,123	2,379	0,123	0,183	0,669
Dist Océan	1,071	0,301	1,071	0,301	1,708	0,191
Dist Forêt	3,239	0,072	3,239	0,072	3,239	0,072
Annualtemp	3,744	0,053	3,744	0,053	0,826	0,363
Annualrainf	2,449	0,118	2,449	0,118	0,338	0,561
Tempvariab	1,201	0,273	1,201	0,273	2,35	0,125
Rainfallvariab	2,038	0,153	2,038	0,153	0,041	0,839
Log-Likelihood	-6,109		-5,004		-5,004	
AIC	14,217		12,008		12,008	

Annexe 2 : tableau des présences et absences des espèces de punaises aquatiques dans les différents sites d'échantillonnage.

Especes	Abong	Ako	Bda	Bank	Buea	Gar	Mbyo	Ndere	San	Tib
Appasus procerus procerus	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Appasus ampliatus	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Appasus grassei grassei	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Appasus nepoides	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hydrocyrius nanus	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
Hydrocyrius colombiae colombiae	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Lethocerus cordofanus	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
Limnogeton fieberi	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Micronecta sp1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
Micronecta sp2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sigara sp	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
Hydrometra albolineatai	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Hydrometra hutchinsoni	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Hydrometra sp	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
Eurymetra sp	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
Gerris swakopensis	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Limnogonus Limnogoides hypoleusis	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
Limnogonus Limnogoides intermidius	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1

Limnogonus Limnogoides poissoni	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Limnogonus Limnogoides sp	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Limnogonus Limnogonus cereiventris	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Neogeris severini	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Rhagadotarsus Caprivia hutchinsoni	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Mesovlia sp1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
Mesovellia sp2	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
Mesovellia vigittigera	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1
Laccocoris discus	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Laccocoris limigenus limigenus	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Macroccoris flavicollis flavicollis	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Macroccoris laticollis laticollis	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
Naucoris obsuratus onsuratus	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Laccotrephes armatus	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0
Laccotrephes calcaratus	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
Laccotrephes dilatatus	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
Laccotrephes fabricii	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
Laccotrephes latimanus	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0
Laccotrephes sp	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
NrL	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
Ranatra bottegoi	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Ranatra Capensis congoensis	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
Anisops Anisops jaczewskii	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Anisops Anisops kampensis	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Anisops Anisops sardeus sardeus	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Anisops Micranisops apicalis	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Anisops Micranisops parvulus	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
Anisops sp	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Enithares glauca	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Enithares sobria	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Neonychia congoensis congoensis	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
NoL1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Nychia marshalli	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
Angelia sp	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
Rhagovelia sp1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Rhagovelia sp2	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
Rhagovelia sp3	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
Hebrus sp	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0

CONCLUSION GENERALE

Outre des travaux plus anciens, la présente thèse constitue une première étude détaillée des punaises aquatiques afro-tropicales. Les différentes approches abordées tout au long de cette étude nous ont permis de développer de nouvelles connaissances sur la taxonomie, la phylogéographie et la biologie des punaises aquatiques du Cameroun, dont certaines seraient potentiellement impliquées dans la transmission de *M. ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli.

Ainsi, grâce à la taxonomie intégrative, nous avons identifié 62 espèces (moléculaires putatives et morphologiques) de punaises aquatiques dans notre collection. Ces espèces appartiennent à 11 familles dont 6 sont de l'infra-ordre de Nepomorpha (Belostomatidae, Corixidae, Micronectidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae) et 5 de l'infra-ordre des Gerromorpha (Gerridae, Hebridae, Hydrometridae, Mesoveliidae, Veliidae). Sur la base des individus présents dans notre collection et d'une revue exhaustive de la littérature, 3 infra-ordres et 15 familles de punaises aquatiques, divisés en 45 genres et 125 espèces dont 95 ont cependant au préalable été rapportés du Cameroun. Nous rapportons dans notre travail 9 genres et 34 espèces nouvellement signalés du Cameroun dont 14 espèces identifiées seulement jusqu'au niveau du genre sont probablement de nouvelles espèces.

Nous avons noté une bonne congruence entre les espèces morphologiques (54 au total) et les espèces moléculaires putatives (41 à 45 espèces selon la valeur du gap considérée). Développée pour combler les manquements de la taxonomie traditionnelle basée sur les critères morphologiques, la taxonomie moléculaire nous a permis d'associer les morphotypes larvaires aux adultes identifiés.

Une revue de littérature sur les habitudes et les adaptations des punaises en milieu aquatique a permis d'analyser le rôle de certains traits écologiques des punaises aquatiques dans la transmission de *M. ulcerans* en les confrontant à la phylogénie des Hétéroptères aquatiques que nous avons produite. L'approche comparative testant le rôle d'une adaptation de certains taxons de punaises à des habitats spécifiques et à un régime alimentaire particulier montre que la fréquentation de plantes aquatiques immergées par certains groupes de punaises et la possession d'un régime macroprédateur favoriseraient l'acquisition de *M. ulcerans* par ces punaises. La capacité de vol semble ne pas être directement impliquée dans l'acquisition de la mycobactérie mais contribuerait à la propagation de cette dernière en favorisant la contamination de nouveaux environnements. Mais, pour qu'il y ait acquisition de la mycobactérie par des punaises, il faut que l'environnement soit contaminé, d'où l'absence d'un biome particulier (zone 4 correspondant à la zone de forêt humide à pluviométrie monomodale) dans les analyses complémentaires effectuées. Pour les punaises aquatiques, se nourrir sur des macro-proies (mollusques d'eau douce et petits poissons en particulier) et vivre dans la végétation aquatique immergée représentent des caractéristiques essentielles pour acquérir cette mycobactérie. Ce travail apporte donc des éléments en faveur d'une acquisition/contamination de certains taxons de punaises, en particulier les Belostomatidae et les Naucoridae, par *M. ulcerans* par voie d'exposition et de fréquentation d'habitats aquatiques favorables et de régimes alimentaires propices à la récupération du bacille. Cette recherche alimente ainsi la discussion actuelle sur la possibilité, ou non, d'une transmission vectorisée de *M. ulcerans* par certaines punaises aquatiques et favorise une transmission par contamination sans pour autant que les punaises y jouent un rôle actif.

L'approche comparative Beast et PhyloType abordée dans cette étude a conduit à décrire la phylogéographie des punaises aquatiques à travers les différentes zones agro-écologiques

(biomes) rencontrées au Cameroun en utilisant le gène mitochondrial (COI) comme marqueur moléculaire. Le biome zone 2, c'est-à-dire la zone de haute savane guinéenne présent dans la majorité des annotations ancestrales dans les deux méthodes s'avère être le centre de diffusion de la plupart des taxons de punaises aquatiques du Cameroun. Le biome zone 2, constitué de la région de l'Adamaoua, est le château d'eau du Cameroun et la plupart des cours d'eau du Cameroun y prennent leur source. Ces cours d'eau pourraient ainsi constituer des corridors ayant contribué, et contribuant très probablement encore, à la dissémination des groupes de punaises aquatiques.

L'étude des communautés d'espèces de punaises aquatiques du Cameroun et une analyse macroécologique de leur organisation a révélé l'importance de l'effort d'échantillonnage fourni au cours de ce travail ainsi que la distance des différents sites par rapport à Yaoundé comme déterminants principaux explicatifs. Notre recherche initiale concentrée en grande partie sur les sites endémiques à ulcère de Buruli situés au centre du Cameroun a ainsi été biaisée par un défaut d'échantillonnage lorsqu'on tente de comprendre les différences entre sites. En contrôlant pour ces effets dans des modèles linéaires généralisés, la distance par rapport à la forêt primaire se révèle être aussi un facteur explicatif de la distribution des espèces d'Hétéroptères aquatiques du Cameroun avec une richesse moindre plus on s'éloigne du domaine forestier.

A la suite de cette première étude, il me semble absolument nécessaire d'étendre ces investigations dans toute la sous-région centrale africaine, et ce dans le but de mieux comprendre la systématique, la biogéographie et l'écologie de ces Hétéroptères aquatiques. Avant tout, ce travail m'a initié à plusieurs concepts et méthodologies qui étaient très nouvelles pour moi. Audelà de cette acculturation, je suis consciente aujourd'hui que le protocole d'échantillonnage réalisé au démarrage de mon étude pouvait permettre de répondre à des questionnements de taxonomie, de systématique ou, encore, de biologie moléculaire dans le but de rechercher des signatures moléculaires de *M. ulcerans*. Toutefois, et ce afin de répondre à des questions d'écologie de la transmission infectieuse ou d'écologie des communautés, il m'apparaît évident de repenser et de ré-organiser les plans d'échantillonnage avant tout travail de terrain car les biais d'échantillonnage peuvent être rendus responsables de certains facteurs explicatifs que l'on pense mettre en évidence.

Dans les analyses moléculaires que j'ai effectuées, seul le gène mitochondrial COI a été pris en compte car il s'est révélé que l'utilisation d'un second gène COII ou même la concaténation de COI et COII engendraient énormément de bruits dans les phylogénies reconstruites. Il me semble nécessaire d'utiliser d'autres gènes mitochondriaux (16SrRNA, 28SrRNA) et nucléaires (gène codant pour le facteur d'élongation 1 alpha : EF-1α ; pour ce genre d'analyses.

Au terme de ces travaux de thèse, nous avons une bonne connaissance de la distribution et de l'organisation de la diversité biologique des communautés de punaises aquatiques du Cameroun. Des facteurs écologiques susceptibles de favoriser l'acquisition de la mycobactérie par certains taxons de punaises aquatiques tels que les Belostomatidae et les Naucoridae sont identifiés. Grâce à l'étude des relations ancestrales entre les différents taxons de punaises

aquatiques identifiés dans notre collection, nous avons une idée de la phylogéographie de ces insectes au Cameroun.

Reference

1. Lunn HF, Connor DH, Wilks NE, 1965 ea (1965) Buruli (Mycobacterial) ulceration in Uganda (A New focus of Buruli ulcer in Madi District Uganda): report of field study. East Afr Med Journal 42: 275.

2. Clancey JK, Dodge OG, Lunn HF, Oduori ML (1961) Mycobacterial skin ulcers in Uganda. Lancet 2: 951.

3. Clancey JK (1964) Mycobacterial skin ulcers in Uganda: Description of a new mycobacterium (Mycobacterium Buruli). J Pathol Bacteriol 88: 175.

4. Barker DJ (1972) The distribution of Buruli disease in Uganda. Trans R Soc Trop Med Hyg 66: 867.

5. Barker DJ (1971) Buruli disease in a district of Uganda. J Trop Med Hyg 74: 260.

6. Chauty A, Ardant MF, Adeye A, Euverte H, Guedenon A, et al. (2007) Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans disease) Antimicrob Agents Chemother 51: 4029-4035.

7. Phanzu DM, al. e (2006) Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) in a rural hospital in Bas-Congo, Democratic Republic of Congo 2002-2004. The American journal of tropical medicine and hygiene 75: 311-314.

8. Vincent QB, al. e (2014) Clinical epidemiology of laboratory-confirmed Buruli ulcer in Benin: a cohort study. The Lancet Global health 2: e422-430.

9. Kpadonou TG, Alagnidé E, Azanmasso H, Fiossi-Kpadonou E, Moevi AAH, et al. (2013) Psychosocioprofessional and familial becoming of formers Buruli ulcer patients in Benin. Annals of Physical and Rehabilitation Medicine 56: 515-526.

10. Amofah G, al. e (2002) Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. Emerging infectious diseases 8: 167-170.

11. Bratschi MW, al. e (2013) Geographic distribution, age pattern and sites of lesions in a cohort of Buruli patients from Mapé Basin of Cameroun. PLoS Neglected Tropical Diseases 7: e2252.

12. Debacker M, Anguiar J, Zinsou C, Mayers WM, Scott JT, et al. (2004) Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity Tropical medicine international health: TM IH 9: 1297-1304.

13. Sopoh GE, al. e (2007) Buruli ulcer surveillance, Benin, 2003-2005. Emerging Infectious Diseases 13: 1374-1376.

14. Werf TSVd, Graaf WTvd, Tappero JW, Asiedu K (1999) Mycobacterium ulcerans infection. Lancet 354: 1013.

15. Johnson PD, Stinear T, Small P, al. e (2005a) Buruli ulcer (M. ulcerans infection): new insights, new hope for disease control. PloS Med 2: e108.

16. MacCallum P, Tolhurst JC (1948) A new mycobacterial infection in man. J Pathol Bacteriol 60: 93.

17. Janssens PG, Quertimont MJ, Sienawski J, Gatti P (1959) Necrotic tropical ulcers and mycobacterial causative agents. Trop Geogr Med 2: 293-312.

18. OMS (2015) Annual meeting on Buruli ulcer. http://gamapserverwhoint/mapLibrary/app/searchResultsaspx.

19. ulcer B (2002) disease Mycobacterium ulcerans infection. Wkly Epidemiol Rec 77: 271.

20. Johnson RC, Sopoh GE, Boko M, al. e (2005b) Distribution of Mycobacterium ulcerans (Buruli ulcer) in the district of Lalo in Benin. Trop Med Int Health 10: 863.

21. Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, al. e (2004) Potential role for fish in transmission of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer): an environmental study. Appl Environ Microbiol 70: 5679.

22. Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoa K, al. e (2005) Risk factors for Buruli ulcer disease (Mycobacterium ulcerans Infection): results from a case-control study in Ghana. Clin Infect Dis 40: 1445.

23. Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, al. e (1997) Detection of Mycobacterium ulcerans in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. Appl Environ Microbiol 63: 4135.

24. Bratschi MW, Ruf MT, Andreoli A, al. e (2014) Mycobacterium ulcerans persistence at a village water source of Buruli ulcer patients. PLoS Negl Trop Dis 8: e2756.

25. Asiedu K, Scherpbier R, Raviglione M (2000) Buruli ulcer: Mycobacterium ulcerans infection. Geneva: WHO.

26. Barker DJ (1973) Epidemiology of Mycobacterium ulcerans infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 67: 43.

27. Revill WD, Barker DJ (1972) Seasonal distribution of mycobacterial skin ulcers. Br J Prev Soc Med 26: 23.

28. Exner K, Lemperle G (1987) Buruli ulcer--necrotizing infection of the hand of a plastic surgeon. Handchir Mikrochir Plast Chir 19: 230.

29. Debacker M, Zinsou C, Aguiar J, al. e (2003) First case of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer) following a human bite. Clin Infect Dis 2003: e67.

30. Williamson HR, Mosi L, Donnell R, al. e (2014) Mycobacterium ulcerans fails to infect through skin abrasions in a guinea pig infection model: implications for transmission. PLoS Negl Trop Dis 8: e2770.

31. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne P-A, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of Mycobacterium ulcerans infection The Lancet 353: 986.

32. Portaels F, Meyers WM, Ablordey A, al. e (2008) First cultivation and characterization of Mycobacterium ulcerans from the environment. PLoS Negl Trop Dis 2: e178.

33. Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK (1974) Human Mycobacterium ulcerans infections developing at sites of trauma to skin. Am J Trop Med Hyg 23: 919.

34. Carolan K, Ebong SM, Garchitorena A, al. e (2014) Ecological niche modelling of Hemipteran insects in Cameroon; the paradox of a vector-borne transmission for Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer. Int J Health Geogr 13: 44.

35. Marsollier L, Robert R, Aubry J, André J-PS, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic Insects as a Vector for Mycobacterium ulcerans Applied and Environmental Microbiology 68: 46234628.

36. Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, al. e (2008) Distribution of Mycobacterium ulcerans in buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. PLoS Negl Trop Dis 2: e205.

37. Benbow ME, Williamson H, Kimbirauskas R, McIntosh MD, Kolar R, et al. (2008) Aquatic Invertebrates as Unlikely Vectors of Buruli Ulcer Disease. Emerging Infectious Diseases 14: 1247-1254.

38. Johnson PD, Azuolas J, Lavender CJ, al. e (2007) Mycobacterium ulcerans in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. Emerg Infect Dis 13: 1653.

39. Lavender CL, Fyfe JA, Azuolas J, al. e (2011) Risk of Buruli ulcer and detection of Mycobacterium ulcerans in mosquitoes in southeastern Australia. PLoS Negl Trop Dis 5: e1305.

40. Carson C, Lavender CJ, Handasyde KA, al. e (2014) Potential wildlife sentinels for monitoring the endemic spread of human buruli ulcer in South-East australia. . PLoS Negl Trop Dis 8: e2668.

41. Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Merritt RW, André J-PS, et al. (2004a) Aquatic Snails, Passive Hosts of Mycobacterium ulcerans. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 70: 6296-6298.
42. Willson SJ, Kaufman MG, Merritt RW, Williamson HR, Malakauskas DM, et al. (2013) Fish and amphibians as potential reservoirs of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer disease. Infect Ecol and Epidemiol 3: 1-13.

43. Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, al. e (2004) Potential role for fish in transmission of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer): an environmental study. Appl Environ Microbiol 70: 5679.

44. Gryseels S, Amissah D, Durnez L, al. e (2012) Amoebae as potential environmental hosts for Mycobacterium ulcerans and other mycobacteria, but doubtful actors in Buruli ulcer epidemiology. PLoS Negl Trop Dis 6: e1764.

45. Amissah NA, Gryseels S, Tobias NJ, al. e (2014) Investigating the role of free-living amoebae as a reservoir for Mycobacterium ulcerans. PLoS Negl Trop Dis 8: e3148.

46. Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint A, Paul J, et al. (2004b) Aquatic Plants Stimulate the Growth of and Biofilm Formation by Mycobacterium ulcerans in Axenic Culture and Harbor These Bacteria in the Environment. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 70: 1097-1103.

47. Stys P, Antti J (1988) Check-list of recent family-group and genus-group names of Nepomorpha (Heteroptera) of the world. Acta Entomologica Fennica 50: 1-44.

48. Andersen NM (1982) The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. Entomonograph 3: 1-455.

49. Polhemus JT, Polhemus DA (2007) Global diversity of true bugs (Heteroptera; Insecta) in freshwater. . Hydrobiologia 595: 379 - 391.

50. Schuh RT, Slater JA (1988) True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) classification and Natural History. Cornell University Press, Ithaca and London: 1-336p.

51. Poisson R (1959) Contribution à l'étude des Hydrocorises des Comores (Mission J. Millot 1953-1954). Mémoire de l'institut Scientifique de Madagascar: 200-224.

52. Poisson R (1935) Hemiptera aquatica (Mission scientifique de l'Omo). Zoologie 3: 291-218.

53. Poisson R (1960) Hémiptères aquatiques (Mission zoologique de l'I.R.S.A.C en Afrique orientale). Ann Mus Congo Tervuren in 8, Zool 81: 450-452.

54. Poisson R (1929) Contribution à la faune du Cameroun Hémiptères aquatiques. Faune Colon Fr 3: 135–164.

55. Poisson R (1937) Voyage de M. P.-P. Grassé en Afrique Occidentale Francaise. Hemiptera aquatica. Ann Soc Entomol Fr 106: 115–132.
56. Poisson R (1941c) Voyage de M. L. Chopard en Côte d'Ivoire (1938-39) - Hémiptères aquatiques. Rev Fr Entomol 8: 77-82.

57. Poisson R (1948a) Hydrocorises du Cameroun. Mission J. Carayon 1947. Rev Fr Entomol 3: 167–177.

58. Poisson R (1948b) Sur quelques Naucoridae africains des collections du Musée du Congo (Hémipt. – Hétéropt.). Rev Zool Bot Afr XLI: 202-221.

59. Andersen NM (1995) Cladistic, historical biogoegraphy, and a checklist of gerrine water striders (Hemiptera, Gerridae) of the world. Steenstrupia 21: 93-123.

60. Medler JT (1980) Insects of Nigeria - check list and bibliography. Memoirs of the American Entomological Institute (Gainesville) 30: 1-919.

61. Dethier M, Jean iD, Durand R, Lévêque C (1981) Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahelo-soudanienne. ORSTOM 2: 662-771.

62. Poisson R (1941b) Hemiptères aquatiques du Cameroun (Mission Lepesme, Paulian et Villiers, 1939). Bulletin de la Société Entomologique de France: 4.

63. Poisson R (1940a) Contribution à l'étude des Gerris africains (Hémiptères Gerridae) : sur la synonymie de G. swakopensis (Stâl) et G. diversa (Mayr) et description d'une nouvelle espèce. Extrait du Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne 17. : 1-19.

64. Poisson R (1945) Quelques Hémiptères aquatiques africains et malgaches par Raymond Poisson. Bulletin de la Société Entomologique de France: 7.

65. Poisson R (1941a) Contribution à la connaissance des espèces africaines du genre Microvelia westwood Mission de CH. Alluaud et R. Jeannel en Afrique Orientale (Hémiptères Gymnocérates) par Raymond Poisson. . Revue Française d'Entomologie 8: 26.

66. Poisson R (1940c) Sur quelques Hémiptères aquatiques des collections du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique Bulletin du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique Tome 16: 1- 20.

67. Villiers A (1952) Hémiptères de l'Afrique Noire (punaises et cigeles). Institut Français d'Afrique Noire 9: 1-43.

68. Poisson R (1940b) Sur quelque Hémiptères aquatiques des collections du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique. Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne 17: 1-17.

69. Poisson R (1951a) Contribution à l'étude des Helotrephidae, Microvelia westwood (Veliidae), Hebrus curtis (Hebridae) de la faune éthiopienne (Hémitères-Hétéroptères) par Raymond Poisson. Societas Scientiarum Fennica 12: 1-22.
70. Poisson R (1951b) Contribution à l'étude des Hydrocorises de Madagascar (Mission J. Millot 1947-1948) Institut Scientifique de Madagascar 5: 79-130.

71. Poisson R (1951c) Hemiptera Heteroptera : Hydrocorisae & Geocorisea-Gerroidea Results of the Lund University Expedition in 1950-1951. South African Animal Life 4: 327-373.

72. Poisson R (1965a) Catalogue des Hétéroptères Hydrocorises africano-malgaches de la famille des Nepidae (Ltreille) 1802. Bulletin de l' IFAN Tmoe XXVII: 229-269.

73. Poisson R (1965b) Catalogue des Insectes Hétéroptères Gerridae Leach, 1807s africanomalgaches Bulletin de l' IFAN Tome XXVII: 1466 -1503.

74. Chen P-p, Nieser N, Zettel H (2005) The aquatic and semi-aquatic bugs (Heteroptera: Nepomorpha and Gerromorpha) of Malesia. Fauna Malesiana Handbook 5: 1 - 546.

75. Goodwyn PJP (2006) Taxonomic revision of the subfamily Lethocerinae Lauck & Menke (Heteroptera: Belostomatidae). Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde 695: 1-72.

76. Ribeiro JRI, Meyin-A-Ebong S, Le-Gall P, Guilbert E (2014) A taxonomic synopsis of Limnogeton Mayr, 1853 (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae). Zootaxa 3779: 573-584.

77. Andersen NM, Weir TA (2004) Australien Water bugs their biology and identification (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha & Nepomorpha). Entomograph 14: 1-396.

78. Mbogho AY, Sites RW (2013) Naucoridae Leach, 1815 (hemiptera: Heteroptera) of Tanzania. African Invertebrates 54: 513-542.

79. Polhemus JT (1979) Family Naucoridae Pp. 131-138 in Menke, A. S. (Ed.): The Semiaquatic and Aquatic Hemiptera of California (heteroptera: Hemiptera). Bulletin fo the the Californian Insects Surveys 21: ix + 166

80. Poisson R (1949) Sur quelques espèces nouvelles d'Hydrocorises de l'Afrique Orientale [Hem. Hétéropt.] (note préliminaire) Bulletin de la Société Entomologique de France 6.

81. Poisson R (1967) Contribution à la faune du Congo (Brazzaville) mission A. Villiers et A. Descarpenttries LXIII Hémiptères Hydrocorises. Bulletin de l' IFAN Tome XXIX: 13221333.

82. Poisson R (1963) Mission de M. H. Bertrand (1958-1959-1960) en Afrique éthiopienne et Madagascar Hydrocorises. Bulletin de l' IFAN 25: 1170-1207.

83. Poisson R (1955) Hydrocorises récueillis par M. Omer-Cooper en Rhodesie et au Transvaal Rev Zool Bot Afr 32: 261-270.

84. Poisson R (1966) Catalogue des Insectes Hétéroptères Notonectidae Leach, 1815 africanomalgaches. Bulletin de l' IFAN 28: 729-768.

85. Parsons MC (1970) Respiratory significance of the thoracic and abdominal morphology of the three aquatic bugs Ambrys, Notonecta and Hesperocorixa (Insecta, Heteroptera). Zeitschrift für Morphologie das Tiere 66: 242-298.

86. Andersen NM (1975) The Limnogonus and Neogerris of the old world with character analysis and a reclassification of the Gerrinae (Hemiptera Gerridae). Entomol Scand Suppl 7: 1-96.

87. Grasse P-P (1974) Raymond A. Poisson (1895–1973) sa vie et son oeuvre. Bulletin biologique de la France et de la Belgique 108: 191–204.

88. Andersen NM (1977) A new and primitive genus and species of Hydrometridae (Hemiptera, Gerromorpha) with a cladistic analysis relayionships within the family. Entomol Scand 8: 301-316.

89. Dupin FdS (1973) Hétéroptères Hydrocorises de l'Afrique Orientale. Italiano Journal of Zoology 5: 1-14.

90. Poisson R (1964) Sur quelques espèces nouvelles d'Hydrocorises des collections du Musée Royal de l'Afrique Centrale. Rev Zool Bot Afr 49: 113-120.

91. Poisson R (1944) Contribution à la connaissance des espèces africaines du genre Hebrus Curtis 1833 (Hémiptera Gymnocerata) (Mission de Ch. Alluaud et Jeannel en Afrique Orientale). Revue Française d'Entomologie 10: 89-112.

92. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci 270: 313-321.

93. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc R Soc Lond B Biol Sci 270: 96-99.

94. Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol Amp Evol 18: 70–74.

95. Hudson RR, Turelli M (2003) Stochasticity overrules the "three-times rule": genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. Evolution 57: 182-190.

96. Brown WMM, George JR, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1967- 1197 1961.

97. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biology 2: 1657-1663.

98. Ward PS (2011) Integrating molecular phylogenetic results into ant taxonomy. Myrmecological News 15: 21-29.

99. Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. PNAS 103: 968–971.

100. Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation Mol Ecol 21: 1864–1877.

101. Damgaard Ja, perling FAHS (2001) Phylogeny of the water strider genus Gerris Fabricius (Heteroptera: Gerridae) based on COI mtDNA, EF-1α nuclear DNA and morphology. SYSTEMATIC ENTOMOLOGY 26: 241-254.

102. Garchitorena A, Roche B, Kamgang R, Ossomba J, Babonneau J, et al. (2014) Mycobacterium ulcerans Ecological Dynamics and Its Association with Freshwater Ecosystems and Aquatic Communities: Results from a 12-Month Environmental Survey in Cameroon. PLoS Neglected Tropical Diseases 8: 1-11.

103. Mosi L, Williamson H, Wallace JR, Merritt RW, Small PLC (2008) Persistent Association of Mycobacterium ulcerans with West African Predaceous Insects of the Family Belostomatidae. Applied and Environmental Microbiology 74: 7036-7042.

104. IRAD (2008) Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Rapport national: 1-83.

Annexe 1: Clé d'identification des familles et sous-familles de Nepomorpha récoltées au Cameroun

1. Rostre large et triangulaire, non segmentée portant des rainures transversales parallèles, tarses avant non segmentés (parfois fusionnés avec le tibia), en forme de cuillère ou de faucille, rarement cylindrique, avec une frange de longues soies sur sa face ventrale, tête, pronotum et hémélytres souvent rayésd'une alternance de traits sombres et claires …….…..……..…. Corixidae

- Taille faible (souvent moins de 4 mm), écusson (scutellum) visible, pas de rainures sur l'embolium …..……. Micronectinae
- Taille plus forte 5 à 8 mm, écusson entièrement caché par le pronotum, Cannelure (ou rainure) nette sur l'embollium ……..Corixinae

— Rostre cylindrique ou conique, segmenté, sans rainures transversales, tarses avant segmentés ou non, non frangés de soies, pas de coloration sur la tête, le pronotum et les hémélytres ……..……...2

2. Extrémité postérieure de l'abdomen muni d'un siphon respiratoire, corps cylindrique ou ovoïde, aplati dorsoventralement, de moyenne à grande taille, pattes antérieures ravisseuses (excepté Limnogeton)……. 3

— Extrémité postérieure de l'abdomen sanssiphon respiratoire, corps aplati dorso-ventralement ou très convexe, de très petite à moyenne taille, pattes antérieures ravisseuses souvent modifiées chez les males ….....……4

3. Siphon respiratoire non rétractile, généralement long et filiforme, tous les tarses avec un seul article…….……...…..……..……...Nepidae

- Corps ovalaire, fortement aplati ; hanche antérieure courte ; tibia antérieur presque de même longueur que le fémur ; dent située à la base du fémur ……..……...……. Nepinae

- Corps cylindrique, très allongé et grêle ; hanche antérieure très longue et cylindrique ; tibia antérieur beaucoup plus court et fusionné au tarse ; dent située à l'apex du fémur ……..……..……. Ranatrinae

— Siphon respiratoire court et rétractile, tarses de 2 ou 3 articles rarement le tarse antérieur ne comportant qu'un article, tibias intermédiaires et postérieurs généralement aplatis et frangés de soies adaptés à la nage ……..…….……Belostomatidae

- Espèces de très grande taille ; Corps allongé ; yeux globuleux avec des cils en arrière ; 2e et 3e articles antennaires avec une projection latérale et le 4e avec 2 projections ; pattes antérieures munies d'une griffe ; tibias et tarses des pattes postérieures fortement comprimés, mince et plus aplatis que les tibias et tarses des pattes intermédiaires ; nervures de la membrane des hémélytres non ramifiées
  ……..……... (Lethocerinae)

- Espèces moyennes à grande taille ; corps ovalaire et large ; yeux triangulaires larges en arrière ; 2e et 3e articles des antennes avec une projection latérale et le 4e long ; pattes antérieures munies de 2 griffes ; tibias et tarses des pattes postérieures similaires à ceux des pattes intermédiaires ; membrane des hémélytres avec des nervures ramifiées …….……..……. Belostomatinae

4. Tête et prothorax non fusionnés ; ocelles absents ; antennes courtes de 4 quatre articles ; membrane des hémelytres sans nervures ……..……..5

5. Corps ovalaire aplati dorso-ventralement ou légèrement convexe; yeux larges avec les marges externes régulières épousant les contours de la tête ; pattes antérieures ravisseuses avec un fémur renflé et fortement dilaté ; tarses antérieurs généralement fusionné au tibia formant 1 ou 2 articles avec une, deux ou pas de griffe ; tarses

intermédiaires et postérieurs de 2 articles bien distincts munis de 2 griffes; rostre robuste de 3 articles .....……...…….Naucoridae

- Marge antérieure du pronotum droite ou faiblement convexe derrière la région interoculaire ; bords latéraux du pronotum plus ou moins régulier ; tarses antérieurs à 1 article, fémurs antérieurs pourvus d'une rangée de soies sur la face postérieure ; fémurs intermédiaires
  dépourvus de courtes soies sur la face inférieure ……..……... Naucorinae

- Marge antérieure du pronotum fortement convexe vers l'arrière ; bords latéraux sous forme de feuillets ; tarses antérieurs de 2 articles, fémurs antérieures pourvus de 2 rangées de soies bien visibles sur la face postérieure ; fémurs intermédiaires pourvus de 2 rangées de soies raides bien visibles sur la face inférieure ……....…….. Laccocorinae

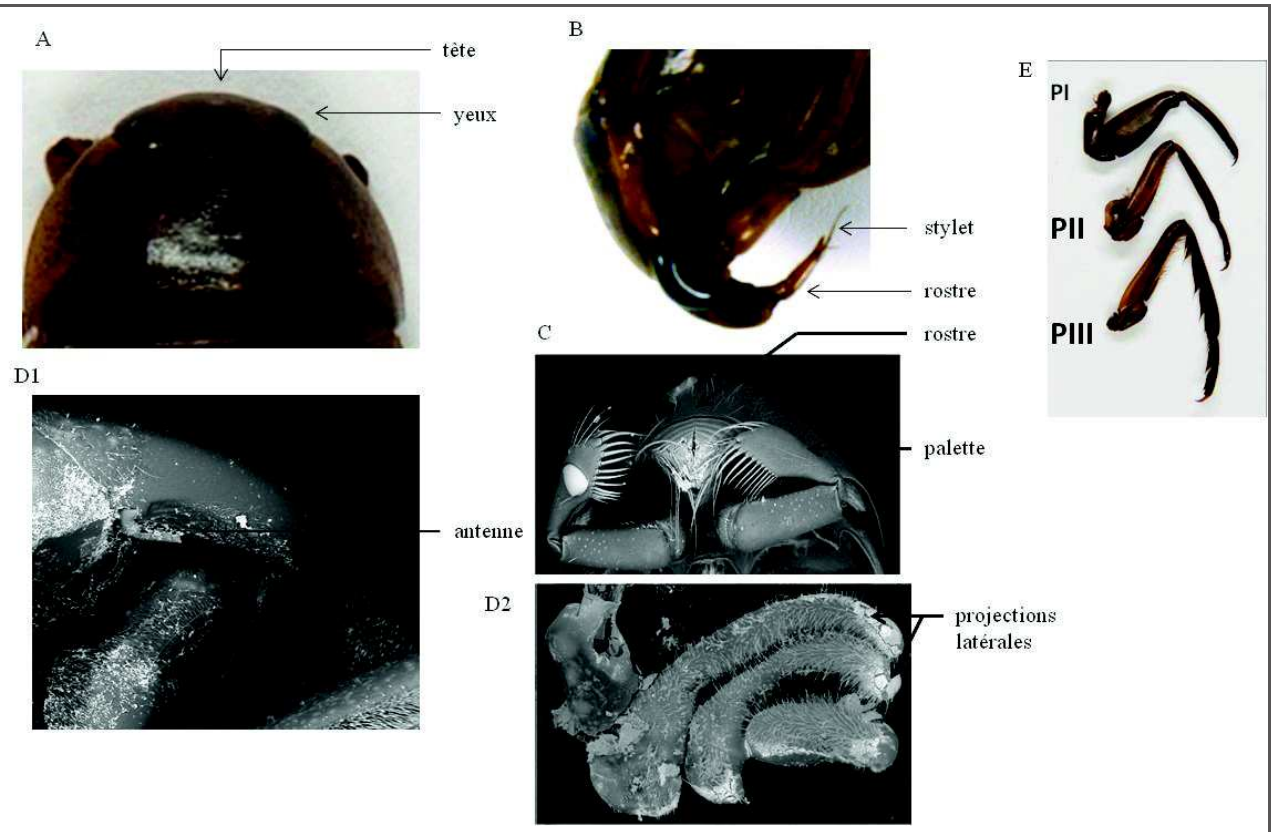
— Corps allongé généralement convexe sur sa face dorsale ; yeux larges et parfois jointifs en arrière ; pattes antérieures non ravisseuses et souvent modifiées chez les mâles ; tarses antérieurs et intermédiaires généralement de 2 articles, le 1er souvent réduit ou absent, tarses postérieurs de 2 articles distincts ; pattes postérieures transformées en palettes natatoires ; rostre de 3 ou 4 articles ..……..…… Notonectidae

- Corps fortement convexe sur la face dorsale ; hémélytres transparents ; commissure des hémélytres pourvue antérieurement d'une fossette poilue ; tibia antérieur des mâles habituellement munis de peignes stridulatoires situés près de la face intérieure
  ……..……...…….……..….. Anisopinae

- Corps peu convexe sur la face dorsale ; hémélytres opaques ; commissure des hémélytres sans fossette poilue ; pas de peignes stridulatoires chez le mâle …….. ……..…….…… Notonectinae

Annexe 2 : Caractères diagnostiques des infra-ordres et familles identifiés

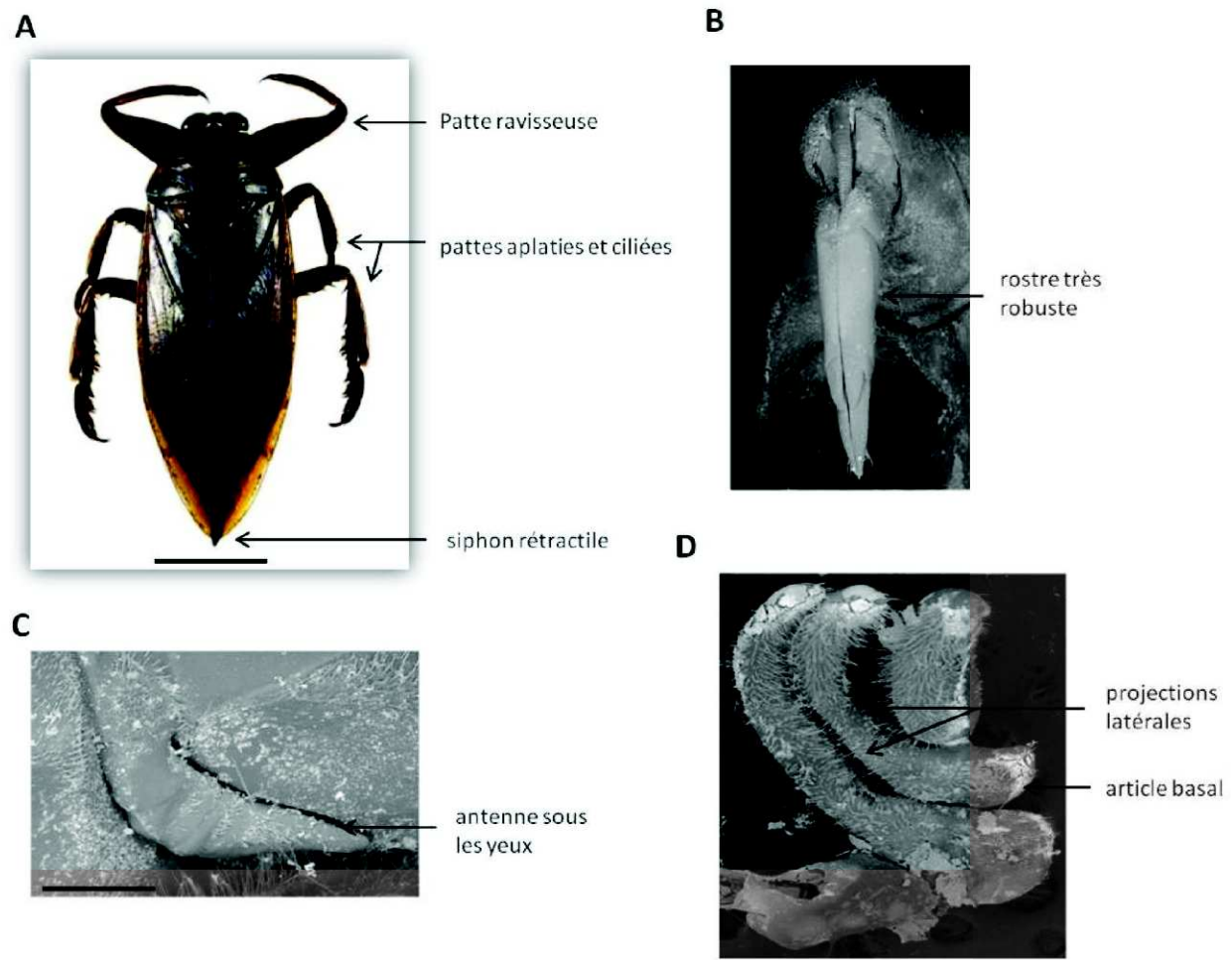
Annexe 2a- Principaux caractères morphologiques des Nepomorpha



A : vue dorsale du pronotum et tête montrant des yeux larges ; B : vue latérale montrant le rostre et le stylet ; C vue ventrale d'un Corixidae montrant son rostre et les tarses transformés en palettes munies d'épines ; D1 : antenne dans sous les yeux ; D2 : antenne de trois articles montrant les projections latérales.

Cet infra-ordre regroupe des Hétéroptères de petite à très grande taille vivant dans différents types de collections d'eau douce. Ils sont caractérisés par : - des yeux composés larges occupant entièrement les côtés de la tête en vue dorsale et latérale (2a. A), - des trichobothries céphaliques absentes, - un rostre généralement court, robuste de trois articles et muni d'un stylet rétractile (2a. B), sauf chez les Corixidae (2a. C), - des antennes en position postéro-ventrale souvent cachées dans une dépression sous les yeux (2a. D1) et les articles 2 et 3 généralement munis de projections latérales (2a. D2), - les pattes antérieures ravisseuses avec un fémur dilaté, - des tarses terminés par une ou deux griffes sauf chez les Corixidae chez qui les tarses antérieurs sont transformés en une palette munie de plusieurs épines (2a. C), - des pattes postérieures aplaties et frangées de soies adaptées à la nage (2a. E), - des ailes antérieures couplées au corps par un mécanisme bien développé, la membrane étant bien séparée du corium et veineuse, - un abdomen montrant diverses modifications permettant la respiration sous l'eau.

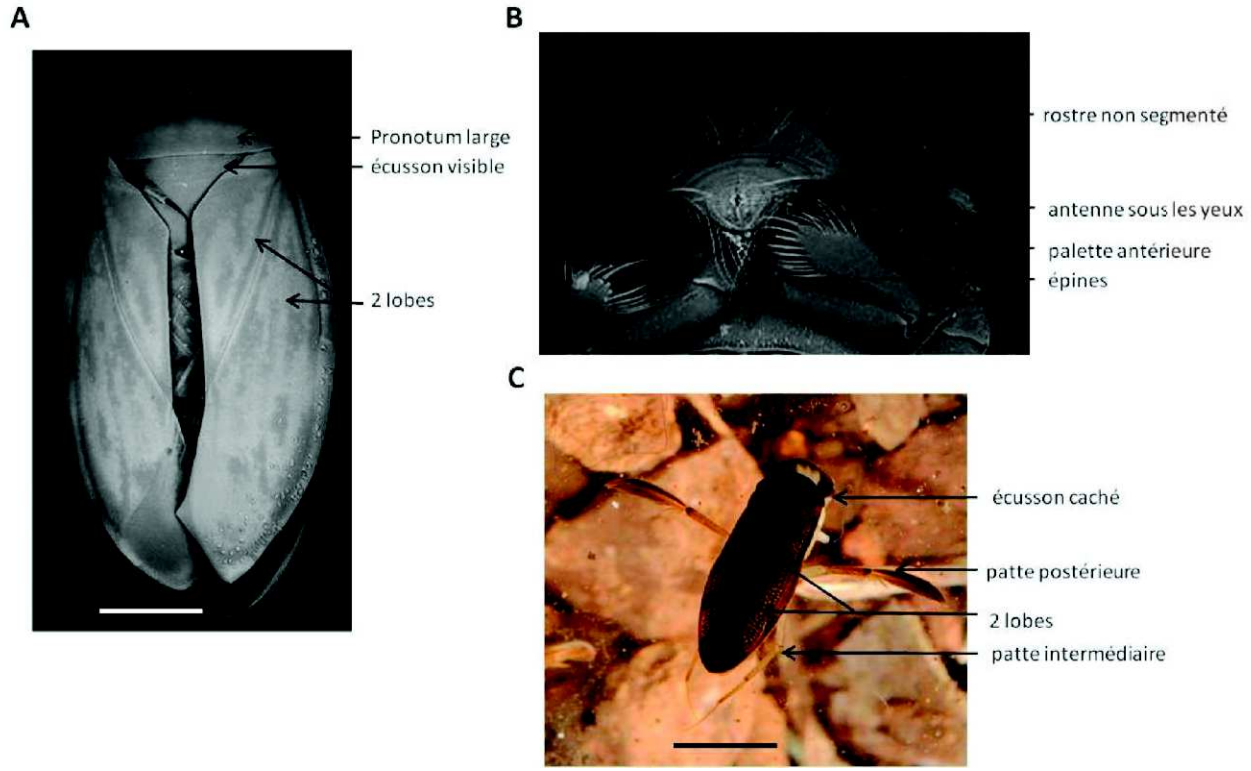
Annexe 2b- Diagnose des Belostomatidae



Caractères morphologiques généraux des Belostomatidae A : aspect envue dorsale, B : rostre, C : projections antennaires, D : antenne cachée sous les yeux.

Corps assez fortement déprimé et aplati dorso-ventralement, - tête conique et saillante en avant des yeux, enfoncée dans le pronotum jusqu'au niveau des yeux (2b. A), -rostre court, robuste et triarticulé (2b. B), -pas d'ocelles, -antennes de 4 articles cachées sous les yeux (2b. C), articles 2 et 3 présentant généralement des projections latérales (2b. D), -hémélytres avec une membrane bien distincte, veinée-articulée, -pattes antérieures ravisseuses avec des fémurs fortement dilatés sauf chez le genre Limnogeton, tibias courts et courbés, s'appliquant étroitement contre la marge antérieure des fémurs, tarses antérieurs de 1 à 3 articles avec 1 ou 2 griffes, -pattes intermédiaires et postérieures plus ou moins aplaties, ciliées, adaptées toutes à la nage, tarses de deux articles, -siphon respiratoire court et rétractile (2b. A).

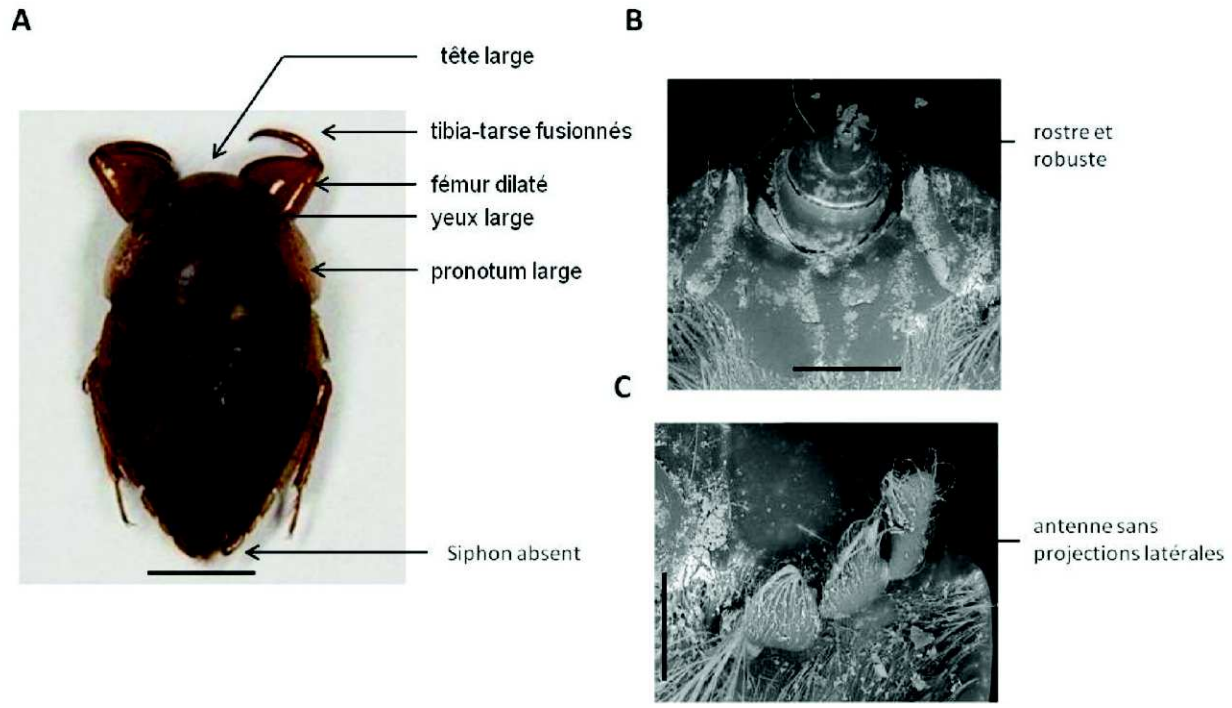
Annexe 2c- Diagnose des Corixidae et Micronectidae



Principaux caractères morphologiques des Corixidae : A : vue dorsale de Micronecta, B : vue ventrale de la partie antérieure, C : vue dorsale de Sigara en pleine nage

Hétéroptères de très petite à moyenne taille (2,5 à 15 mm) de long aplatis dorso-ventralement, -tête courte et triangulaire très hypognathe, -ocelles absents sauf chez Diaprepocorinae, -antennes de 3 à 4 articles cachées entre les yeux et le prothorax, -rostre conique apparemment non segmenté immobile et fusionné à la tête (2c. B), -scutellum visible ou caché par le pronotum, -pronotum et hém-élytres souvent ornés de lignes plus ou moins régulières alternativement jaunes et bruns noirâtres (2c. C), -pattes antérieures courtes, tarses non segmentés transformés en une palette garnie de fortes soies (2c. B), -pattes intermédiaires longues et grêles, -tarse de 1 ou 2 articles munis de deux longues griffes, -pattes postérieures plus robustes, aplaties et frangées de longues soies serrées, tarses de 2 articles pourvus d'une seule griffe réduite et bifurquée, -présence d'un appareil stridulant sous forme de peigne sur la partie basale du tibia antérieur, hémélytres complets sans distinction entre le corium et la membrane.

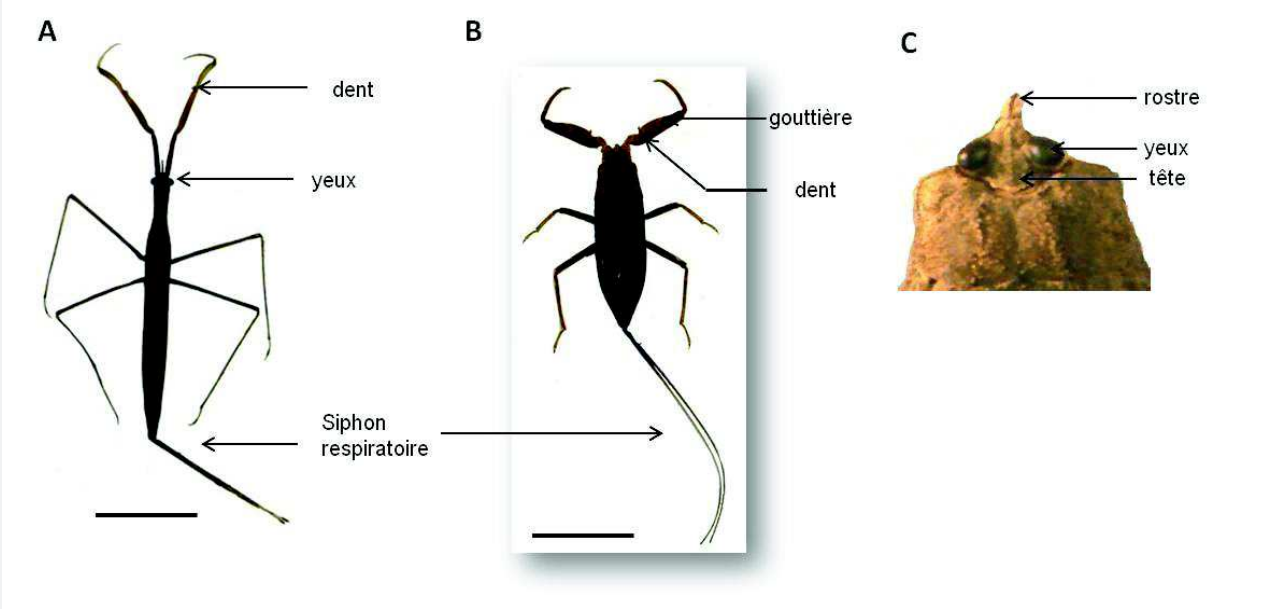
Annexe 2d- Diagnose des Naucoridae



Caractères morphologiques généraux des Naucoridae A : vue dorsale, B : vue ventrale montrant le rostre, C : antenne dans une dépression sous l'œil dépourvue de projections latérales.

Insectes larges, assez convexes, au corps ovalaire, de taille moyenne (5 à 14mm), -tégument lisse, - tête courte, inclinée en avant (prognathe) et enfoncée jusqu'aux yeux dans le pronotum (2d. A), -marge externe des yeux formant une courbe régulière avec celle de la tête qui est transverse et non proéminente, -antennes courtes de 4 articles sans projections latérales (2d. C), -rostre court et robuste de 3 articles (2d. B), -fémur antérieur aplati et très fortement dilaté, marge intérieure présentant une fossette dans laquelle s'applique le tibia au repos, -tibia et tarse soudés formé de 1 ou 2 articles terminés par 1 ou 2 ou même dépourvu de griffes (2d. A), -tarses intermédiaires et postérieurs de 2 articles pourvus de 2 griffes égales, -pattes intermédiaires et postérieures garnies de soies, membrane des hémélytres dépourvue de nervures, Pas de siphon respiratoire (2d. A).

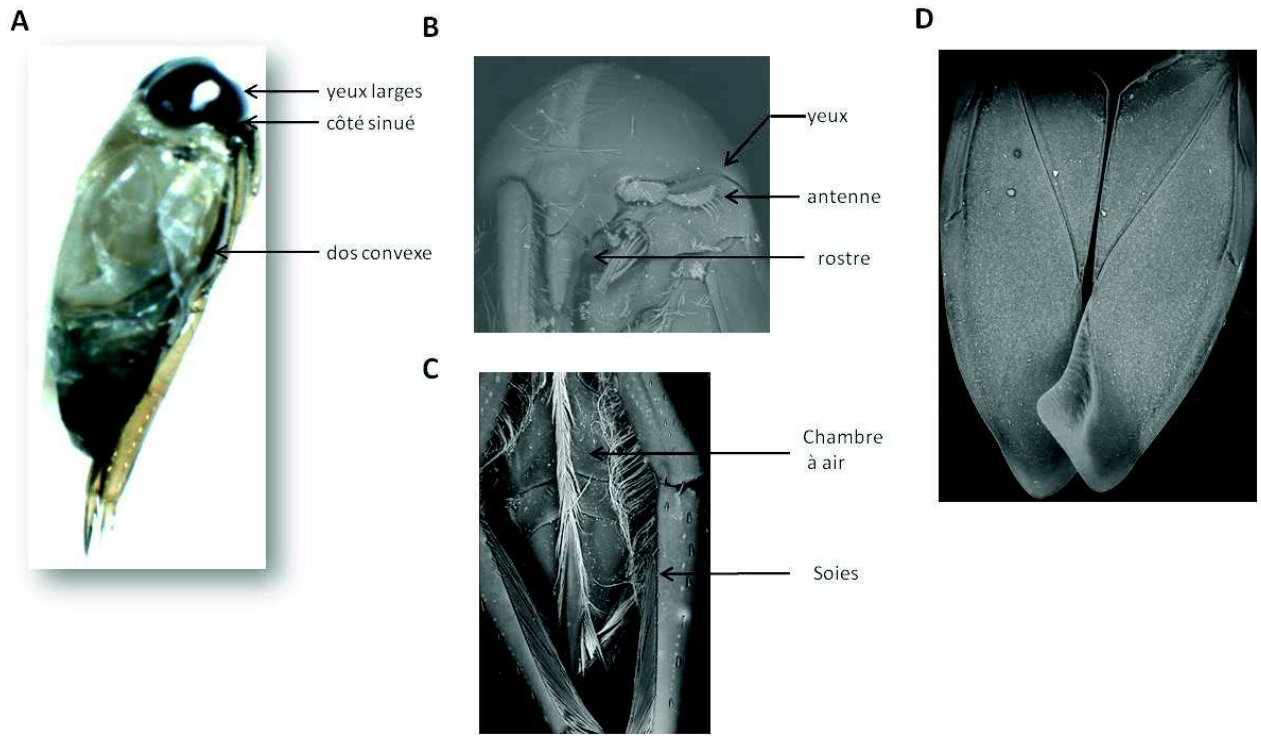
Annexe 2e- Diagnose des Nepidae



Caractères morphologiques généraux des Nepidae A : vue dorsale Ranatra (forme cylindrique), B : vue dorsale Laccotrephes (forme aplatie dorso-ventralement), C : vue dorsale partie antérieure de Laccotrephes montrant des yeux réduits et globuleux et la tête prolongée en avant.

Ce sont des espèces de moyenne à très grande taille 15 à 45 mm de long sans le siphon respiratoire, -corps de forme variable : filiforme et cylindrique ou large et aplati dorso-ventralement, -abdomen toujours prolongé par deux longs filaments creusés en gouttière, non rétractiles et formant le siphon respiratoire qui est court chez certains et très long chez d'autres (2e. A et B), -tête très petite, -yeux relativement petits, saillants et globuleux (2e. C), antennes minuscules de 3 articles cachées dans une dépression sous les yeux, l'article 2 et souvent le troisième munis de projections latérales, -rostre court de 4 articles, -pattes antérieures ravisseuses, fémurs pourvus d'une dent et d'une gouttière sur sa face interne recevant tibia et tarse au repos, -pattes intermédiaires et postérieures marcheuses , -tous les tarses de 1 article terminé par une griffe rudimentaire (antérieurs) et 2 griffes de taille égale (intermédiaires et postérieurs), -membrane des hémélytres réticulée.

Annexe 2f- Diagnose des Notonectidae



Caractères morphologiques généraux des Notonectidae : A : vue latérale, B : vue latérale de la tête, C : face ventrale de l'abdomen, D : hémiélytres montrant les deux parties

Corps comprimé, très convexe sur le dos et aplati sur la face ventrale, -yeux composés très larges et réniformes sinués sur les côtés externes (2f. A), -antennes de 3 à 4 articles dépourvues de projections latérales et cachées dans une dépression entre la tête et le thorax, -rostre court robuste de quatre articles (2f. B), hémélytres divisés en 2 parties disposées en forme de tente et membrane non innervée (2f. D), -tarses antérieurs et intermédiaires généralement de 2 articles, -1er très souvent réduit ou absent, tarses postérieurs de 2 articles toujours présents, -tous les tarses se terminent par deux griffes qui sont moins visibles sur les pattes postérieures. Ces dernières transformées en palettes natatoires frangées de longues soies sur leurs tibias et tarses ; présence de longs poils sur la face ventrale de l'abdomen formant une chambre à air (2f. C).

Annexe 3 : Clé d'identification des familles et sous-familles des Gerromopha identifiés dans nos collectes

1. Macroptères, scutellum visible de forme triangulaire, rond ou en plaque transversale à l'arrière du pronotum ; ou alors aptères ou brachyptères, scutellum non visible, couvert par une extension postérieure du pronotum ……..……..……..……..……..2

2. Bucculae couvrant le 1er et parfois le 2e article du rostre latéralement ; griffes insérées sur la partie apicale du dernier article du tarse ……..……..……..……..3

- Bucculae peu développé couvrant la base du labium ; tarses de 3 articles ……Mesoveliidae

- Bucculae très peu développé ne couvrant pas entièrement la base du labium ; griffes insérées nettement avant le sommet du dernier article des tarses …….....…… 3

3 - Tête très allongée, environ plus de 3 fois plus longue que large ; yeux situés à une distance de la base de la tête ……..……..……Hydrometridae

- Tête plus longue que large ; yeux situés très près ou à la base de la tête ……..…….....4

4. Tête munie d'une ligne longitudinale médiane bien distincte sur sa face dorsale ; tibia antérieur du mâle généralement muni d'un peigne garni de courtes épines le long de la marge intérieure ; fémur postérieur plus robuste que le fémur intermédiaire …….....Veliidae

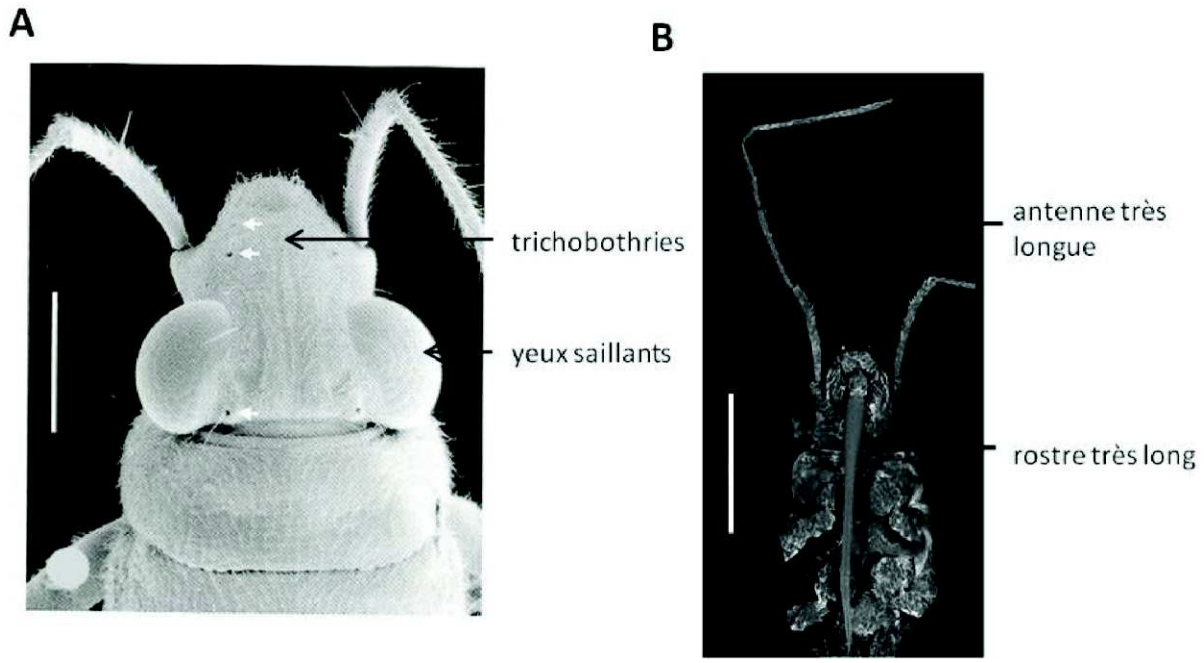
- tarse de 3 articles dont le dernier muni d'une fente profonde abritant une griffe en forme de feuil…….....….. Rhagoveliinae
- Tarse de 3 articles terminés par une griffe …. ……..……..……..……..... veliinae

- Tête sans ligne médiane sur sa face dorsale ; tibia antérieur du mâle sans peigne ; fémur postérieur généralement plus mince que le fémur intermédiaire…….……..…….....Gerridae

- corps allongé, abdomen 2 fois plus long que large, marge intérieure des yeux concave …..…….……...…… Gerrinae
- corps court, abdomen large, marge intérieure des yeux non concave ……..……...……...……..… Rhagadotarsinae
- corps crapu, abdomen réduit, marge intérieure des yeux convexe ……..……..……. Halobatinae

Annexe 4: Caractères diagnostiques des infra-ordres et familles récoltés et identifiés

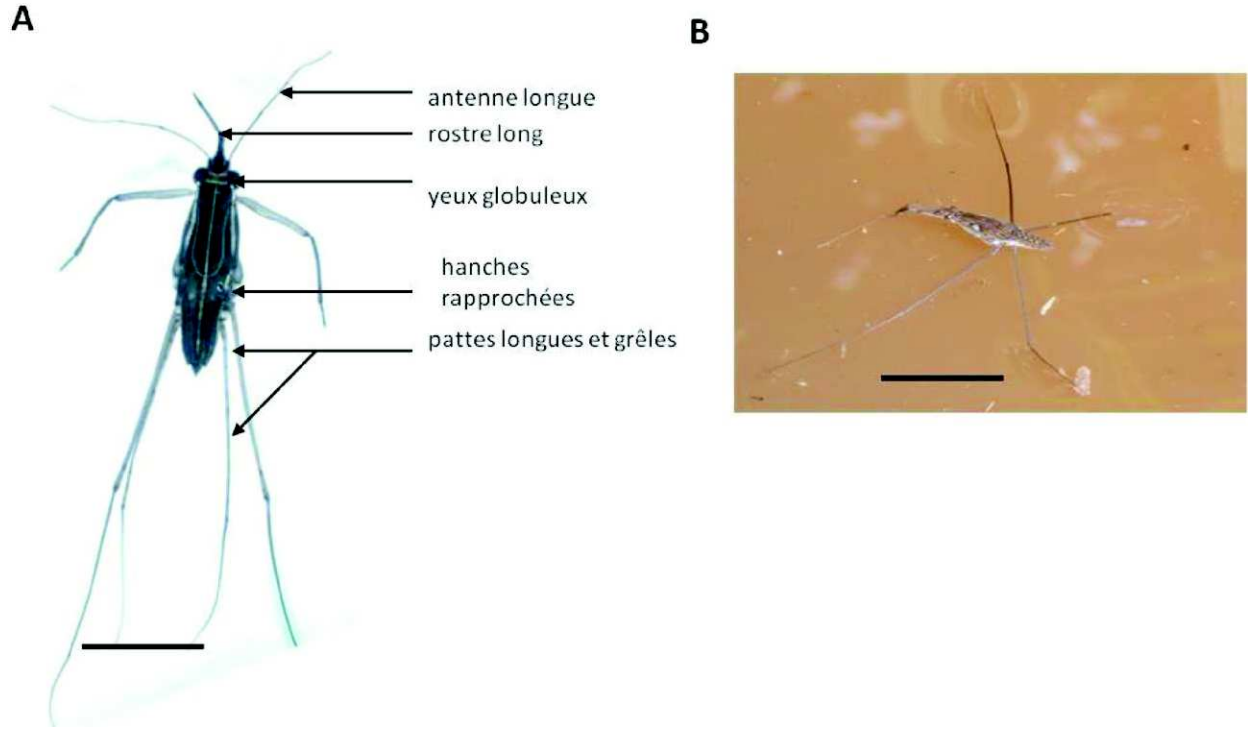
Annexe 4a- Principaux caractères morphologiques des Gerromorpha



A : vue dorsale de la tête montrant les trichobothries céphaliques (source Andersen & Weir, 2004), B : vue ventrale montrant le rostre très long et les antennes très longues de 4 articles

L'infra-ordre des Gerromorpha regroupe des Hétéroptères de petite à moyenne taille vivant aussi bien à la surface des eaux douces que salines et tous sont carnivores. Ils se déplacent sur l'eau en marchant ou en progressant par glissade. Ils sont principalement caractérisés par : une tête généralement allongée, souvent plus ou moins cylindrique faisant saillie en avant des yeux, elle est beaucoup plus courte chez les Veliidae et Gerridae. Les appendices allongés et minces de couleur sombre, 3 paires de trichobothries (rarement 4) sur la tête insérées dans des fosses profondes de la cuticule chez les adultes (2g. A), -rostre allongé articles 1 et 2 très courts, le 3e plus long que le 4e (2g. B), partie basale coriace de l'hémélytre non différenciée de la partie apicale membranaire, généralement, la surface du corps est pourvue de pores sauf chez les Gerridae et Hermatobatidae chez qui le corps est recouvert d'une pilosité hydrofuge. Le polymorphisme alaire est très accentué, au sein d'une même espèce, on trouve des formes macroptères, brachyptères et même aptères.

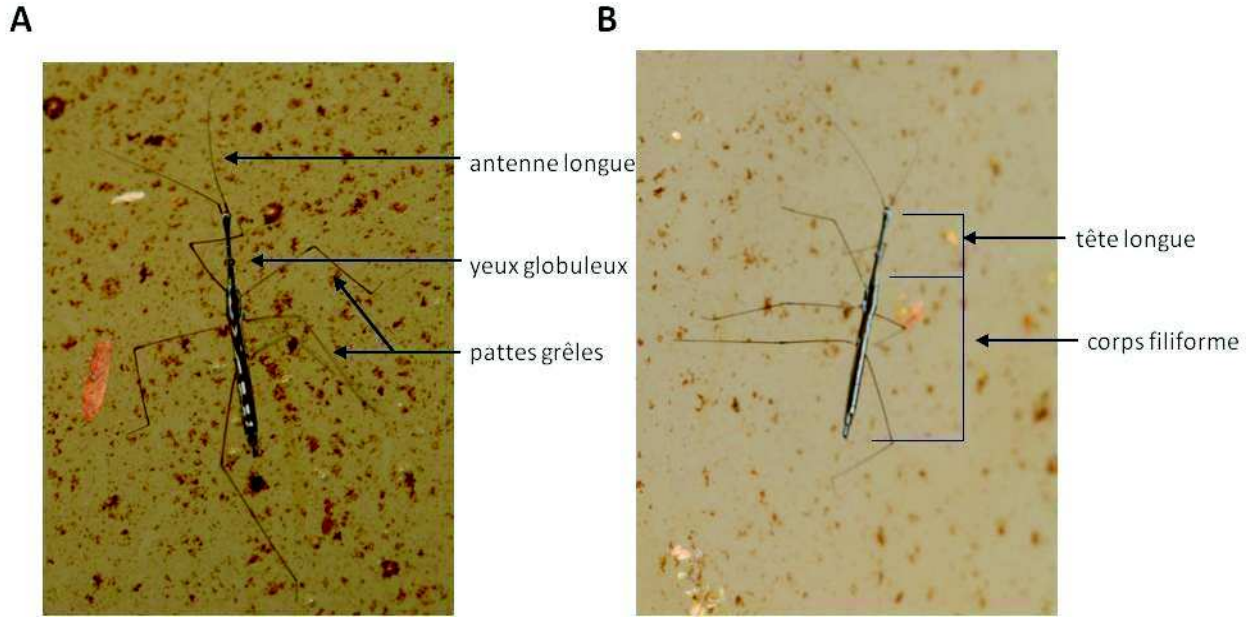
Annexe 4b- Diagnose des Gerridae



Caractères morphologiques généraux des Gerridae A : vue dorsale d'une forme aptère, B : un Gerride patinant à la surface de l'eau

Hémiptères à longues pattes, de petite à moyenne taille (3 à 7 cm) de long pattes exclues, -tête souvent prolongée en avant de la marge intérieure des yeux composés, -ocelles absents, -présence de 4 paires de trichobothries sur la tête, -antennes longues parfois plus longues que le corps de 4 articles, -rostre de 4 articles, le 1er plus long que le 2e,le 3e le plus long et le 4e court, -pattes antérieures courtes et robustes, -pattes intermédiaires et postérieures longues et grêles locomotrices (2h. B), -fémur et tibia généralement de même longueur, -hanches antérieures réduites insérées en avant du thorax, -hanches intermédiaires et postérieures insérées en arrière du thorax (2h. A), -tarses bi-articulées, couverts d'une pilosité dense hydrofuge et griffes insérées dans une encoche subapicale, -polymorphisme alaire très fréquent, -abdomen de taille variable.

Annexe 4c- Diagnose des Hydrometridae



Caractères morphologiques généraux des Hydrometridae : A- B : Hydrometra patinant à la surface de l'eau

Corps linéaire de 2,7 à 22 mm de long, -tête cylindrique très allongée renflée et massue en avant portant les yeux globuleux éloignés de la marge antérieure du prothorax (2i. A-B), -ocelles absents ou présents, -antennes longues filiformes de 4 articles, -rostre grêle de trois articles, plus court que la tête, -corps recouvert de courts poils denses et hydrofuges surtout ventralement, -pattes longues et grêles uniquement ambulatoires, -hanches intermédiaires et postérieures écartées situées sur les côtés du corps, -tarses de 3 articles revêtus de longs poils et terminés par 2 griffes, -polymorphisme alaire fréquent, hémélytres présentant deux nervures principales longitudinales.

Annexe 4d- Diagnose des Mesoveliidae

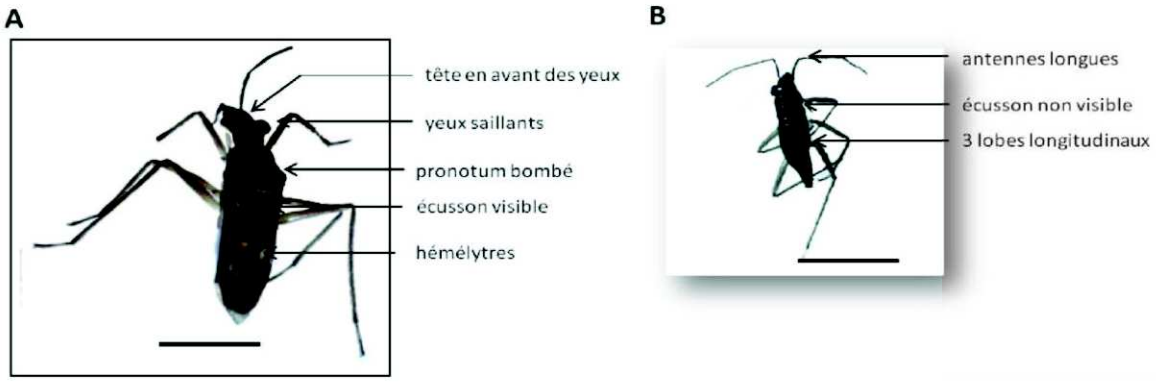
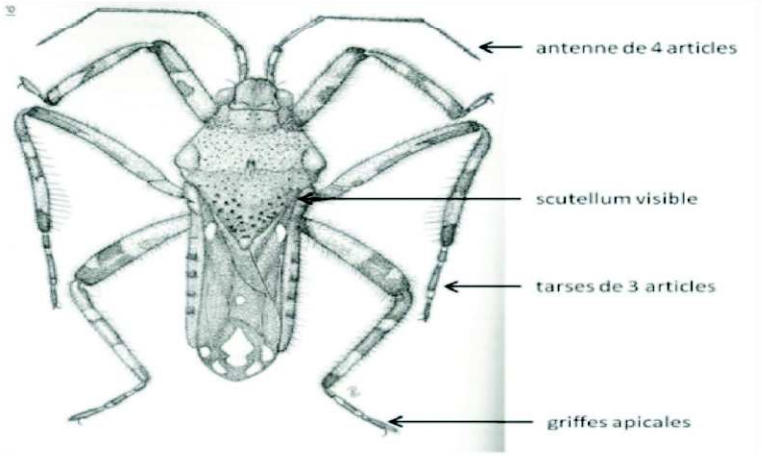


Fig. Caractères morphologiques généraux des Mesoveliidae : **A** vue dorsale d'un macroptères, **B** vue dorsal d'un aptère

Insectes de petite taille environ (4 mm) de long et élancés, -tête large prolongée en avant, -yeux gros et globuleux (2J A), -ocelles présents chez les formes macroptères et vestigiaux chez les formes aptères, -rostre long de 4 articles (1 et 2 très courts, 3 le plus long) atteignant les hanches intermédiaires, -antennes longues et grêles de 4 articles, - scutellum bien développé et visible chez les macroptères, -pronotum divisé en deux lobes inégaux par un léger sillon transverse, ailes antérieures peu innervées, -tarses de 3 articles armés de griffes terminales, polymorphisme alaire très fréquent macroptères ou aptères.

Annexe 4e- Diagnose des Veliidae



Caractères morphologiques généraux des Veliidae vue dorsale d'une forme macroptère
(Source Chen, 2005)

Insectes de petite taille (1à 4 mm) de long, -corps particulièrement la face ventrale recouvert d'une pubescence dense, -antennes de 4 articles, -tête plus courte que le thorax, -rostre de 4 articles, -ocelles présents ou absents, -scutellum bien visible chez les formes macroptères, -présence de 3 paires de trichobothries céphaliques, présence de trichobothries sur la face inférieure des fémurs antérieurs, trochanters antérieurs et intermédiaires, tibias intermédiaires et fémurs postérieurs, -pattes antérieures non ravisseuses, -insertion des griffes apicale ou pré-apicale, -tarses antérieurs de 1 ou 2 articles, -tarses intermédiaires et postérieurs de 2 ou 3 articles.

Articles associés

RESEARCH Open Access

EcologicalnichemodellingofHemipteraninsects inCameroon;theparadoxofavector-borne transmissionforMycobacteriumulcerans,the causativeagentofBuruliulcer

KevinCarolan[1,2*],Solange MeyinÀ Ebong[3],AndresGarchitorena[1,4],JordiLandier[5],DanielSanhueza[1], GaëtanTexier[6,7],LaurentMarsollier[8],PhilipeLeGall[9],Jean-FrançoisGuégan[1,4†]andDannyLoSeen[2†]

Abstract

Background: The mode of transmission of the emerging neglected disease Buruli ulcer is unknown. Several potential transmission pathways have been proposed, such as amoebae, or transmission through food webs. Several lines of evidence have suggested that biting aquatic insects, Naucoridae and Belostomatidae, may act as vectors, however this proposal remains controversial.

Materials and methods: Herein, based on sampling in Cameroon, we construct an ecological niche model of these insects to describe their spatial distribution. We predict their distribution across West Africa, describe important environmental drivers of their abundance, and examine the correlation between their abundance and Buruli ulcer prevalence in the context of the Bradford-Hill guidelines.

Results: We find a significant positive correlation between the abundance of the insects and the prevalence of Buruli ulcer. This correlation changes in space and time, it is significant in one Camerounese study region in (Akonolinga) and not other (Bankim). We discuss notable environmental differences between these regions.

Conclusion: We interpret the presence of, and change in, this correlation as evidence (though not proof) that these insects may be locally important in the environmental persistence, or transmission, of Mycobacterium. ulcerans. This is consistent with the idea of M. ulcerans as a pathogen transmitted by multiple modes of infection, the importance of any one pathway changing from region to region, depending on the local environmental conditions.

Keywords: Ecological niche modelling, Naucoridae, Belostomatidae, Spatial distribution, Habitat suitability, Buruli ulcer, Mycobacterium ulcerans, Vector-borne transmission, Environmentally-acquired disease

Background

The Buruli ulcer is an emerging neglected tropical disease affecting more than 5,000 people per year in West and Central Africa, French Guiana, Latin America and Australia [1]. The disease burden is highest in Africa, where it predominantly affects children under the age of 15, and due to damage to the skin, muscle and bone, can result in severe scarring and crippling deformities if left untreated. The disease is caused by the environmental pathogen Mycobacterium ulcerans.

The mode of transmission of M. ulcerans, the method by which it infects humans, is unknown. Many routes of transmission have been proposed, such as transmission by aerosol [2], vector transmission by amoebae [3] or through aquatic networks [4]. During a study of the association between M. ulcerans and aquatic plants in Ghana and Benin aquatic insects were accidentally collected during the sampling procedure, and unexpectedly found to test positive for M. ulcerans [1]. The authors proposed that, giventhat these insects occasionally bite humans, they may beimplicated in transmissionofM. ulcerans. Aquatic insects have been further implicated afteraseriesoflaboratory experiments demonstratedthe competencyofNaucoridae toactasvectors. Naucoridae areabletoacquire M.ulcerans from their diet,and then

* Correspondence: kevin.carolan@ird.fr
†Equal contributors
[1]Unité mixte de recherche (UMR) Maladies Infectieuses et Vecteurs : Écologie, Génétique, Evolution, et Contrôle (MIVEGEC) IRD-CNRS-Universities of Montpellier I and II, Centre IRD de Montpellier, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France
[2]UMR Territoires, Environnement, Télédétection et Information Spatiale

BioMed Central

© 2014 Carolan et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

transmit thepathogen tomiceresultinginBuruli-like symptoms [5-8].Buruliulceriscommonly associatedwith lowland,stagnant water[9] andhuman behaviours associatedwithwaterbodiesappeartoberisk factorsforBuruli ulcer infection, which would lend support tothe ideaof infectionoccurring inanaquaticcontext.

However, the role ofthese insects has been disputed forseveral reasons. In atwo yearstudy ofBuruli ulcer endemic andnon-endemicsitesinGhana [10],foundno evidence for a role in transmission.The populationof these insects, and the prevalence ofM.ulcerans infec- tion in them, was not significantly different between Buruliulcerendemic andBuruliulcernon-endemicsites [10].The authors argued that, ifthese insects are vectors,wewouldexpect them tohaveahigher abundance inBuruli ulcer endemic sites,that rates ofM.ulcerans infection ofthe insects should behigher inBuruli ulcer endemic sites,and that the rate ofinfection ofthese insectsshouldbehigherthanotherspeciesofinvertebrates.

Theseexpectations arebasedontheBradford-Hill guidelines for associating insect vectors with human vectorbornedisease [11,12].These guidelines provide a general framework to explore the association between vectorsanddisease,basedontheconsistency, specificity, plausibilityandcoherence of theproposed modeof transmission.

Consistencyrefersto theexpectationthattherateof infection oftheproposed vectors,whichshould beconsistentlystronglypositively associated,intimeandspace, with prevalence ofhuman cases.This also implies hu- man casesshould not occur inabsence ofthe proposed vector.Theproposed vectorshould haveademonstrated capacity to physicallytransmitthe pathogen, which has been demonstratedfor M.ulcerans in the lab[5].The interactionbetween the proposed vector and human infection must bespecificand alternative explanations of

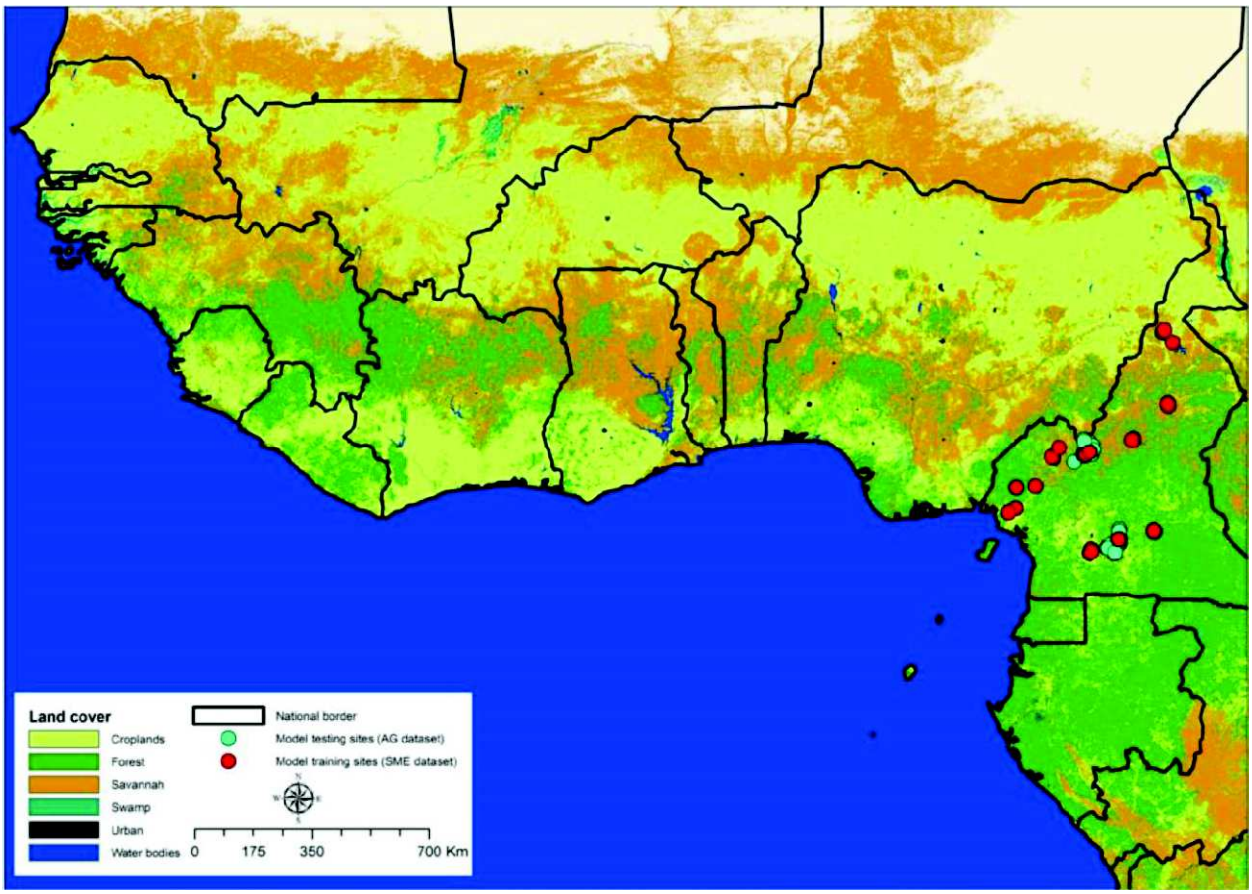


Figure 1StudysitesCamer oonagainst locallandcover.DatafromtheSMEdatasetisinred,andAGdatasetisinblue.Thesamplesites spantheextentof Cameroon,sampling fromeverymajorlandcover category.

Table 1 Environmental variables used in ecological niche modelling

Variable	Units	Original resolution	Source
Wetness index	m^2	15 arc-sec (approx 450 m^2)	SRTM
Flow accumulation	m^2	15 arc-sec (approx 450 m^2)	SRTM
Precipitation in wettest season	millimeter	30 arc-sec (approx 1 km^2)	Bioclim 13
Precipitation in driest season	millimeter	30 arc-sec (approx 1 km^2)	Bioclim 14
GLC-AP	Unitless	300 m^2	GLC 2009
GLC-5 K	Unitless	300 m^2	GLC 2009

All data were resampled to a spatial resolution of 0.004 decimal degrees (~300 m^2) for use in Maxent. Resampling used resample() in the library 'raster' of the software R.

human infection should be ruled out (though see [4] for alternative explanations). That is, human infection must be demonstrated to not have been the result of other potential modes of transmission. We note that this criterion must be applied with care in cases of multi-host transmission.

Additionally, the proposed vector must plausibly be able to be a vector of the pathogen. This criterion is often controversial as it is highly dependent upon the experience of the researcher, and their opinion about what is, and is not, plausible as opposed to merely possible [13]. Most authors in Buruli ulcer research would agree with some basic facts; the waterbugs are infected in the environment [14], they bite humans occasionally, and are able to transmit the bacteria to mice in the lab [5]. However, water bugs are not known to be vectors of other pathogens, and related Mycobacteria (Mycobacterium tuberculosis, M. leprae, M. marnium) are not

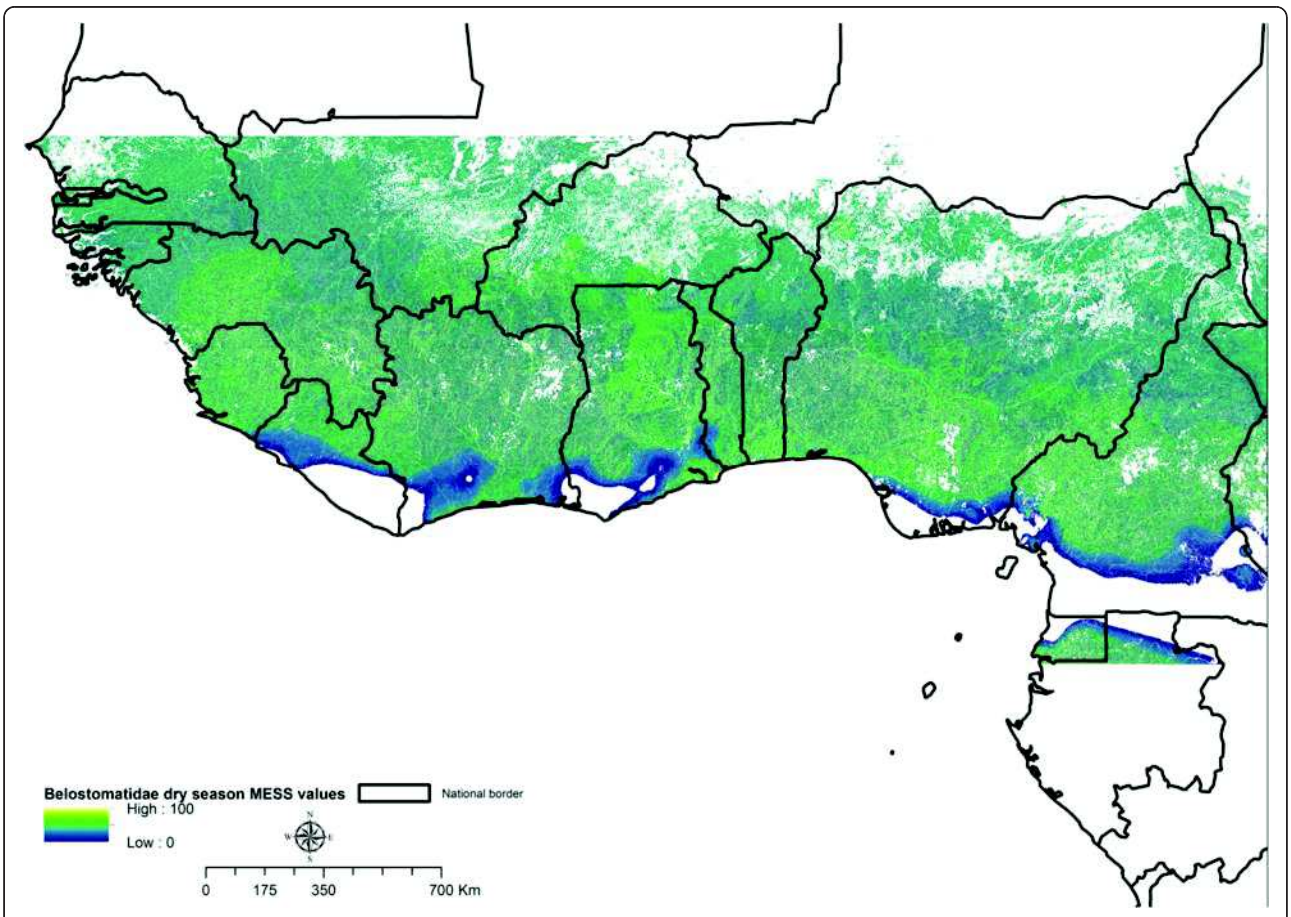


Figure 2 Delineation of the study area. We exclude areas of ecological extrapolation. Across West Africa the red-green coloured region is ecologically interpolative within our sites, according to a multivariate environmental similarity surface (MESS). Regions where we extrapolate beyond the ecology of our study sites are identified using MESS values less than 0. Colour values are MESS values, indicating similarity to sample sites; a value of 100 is identical to the median of the sample sites. The spatial projection of this interpolative region is shown against a map of country borders of West Africa, for Belostomatidae adults in the dry season. This projection changes for each family, developmental stage and season, and though it is spatially discontinuous it is ecologically homogenous.

known to be vector-borne diseases [10,12]. The plausibility of this proposed route of transmission is still debated. The final criterion, coherence, is based on what we already know about the pathogen, the vector and the host. Does the proposed method of transmission fit well with our current understanding of its biology? As our understanding of the biology of M. ulcerans improves, this criterion will be answered.

Given this framework, how likely is it that Naucoridae and/or Belostomatidae are vectors of the Buruli ulcer disease? Herein, we explore the correlation in time and space between the proposed vectors, Naucoridae and Belostomatidae, and the Buruli ulcer prevalence. We discuss the other Bradford-Hill criteria, but do not focus on them specifically, as it was not directly within the scope of this work. Based on sampling in Cameroon, we characterise the set of suitable habitats within which species of the Families Belostomatidae and Naucoridae can maintain a population (their ecological niche) and describe the spatial distribution of these suitable habitats across West Africa. We then explore any correlations between habitat suitability and Buruli ulcer prevalence at multiple spatial scales.

Materials and methods

Distribution of Belostomatidae and Naucoridae aquatic insect families

Data were collected as described in [15] hereafter referred to as the SME dataset. In brief, 36 sample sites in Cameroon were visited monthly from September 2012 to February 2013 (Figure 1), a period including both wet and dry seasons. Dip net sampling was conducted at all sites. Due to limitations of current taxonomic keys, the aquatic insects of interest were only identifiable to the phylogenetic division of Family. A second dataset was used in model validation, using data collected separately by A. Garchitorena (Figure 1). This dataset was collected as described in [16], and is hereafter referred to as the AG dataset. Niche models of Belostomatidae and Naucoridae are constructed using the SME dataset, and then tested on their ability to reproduce the independent AG dataset.

Environmental parameters used in ecological niche modelling

Five ecological parameters were used to describe the distribution of suitable habitats: rainfall, flow accumulation, wetness index, land cover at the sample site, and land

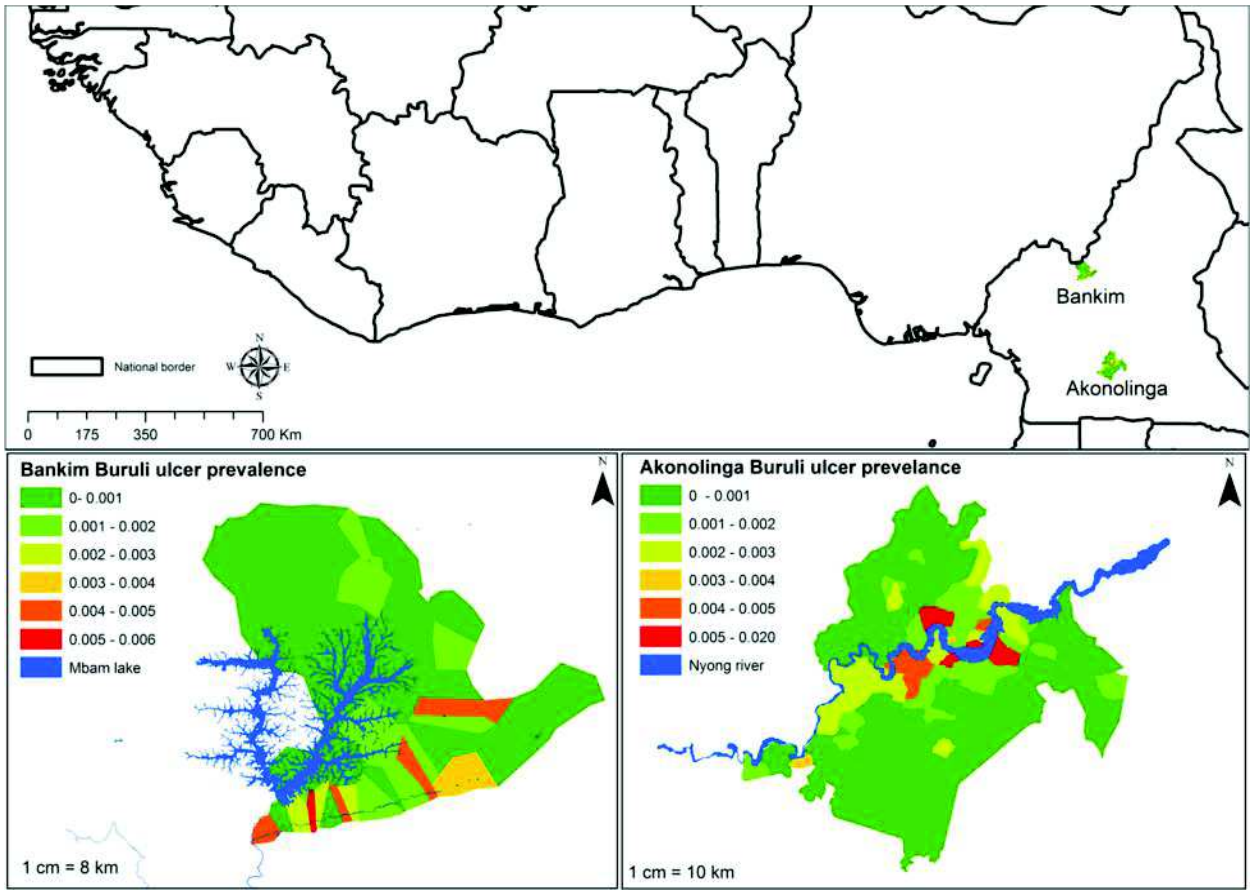


Figure 3 Spatial distribution of Buruli ulcer prevalence in Akonolianga and Bankim, two endemic regions within Cameroon.

cover within the flight range of adult insects. These variables were selected on the basis of their likelihood to influence the distribution and condition of water, and are summarised in Table 1. Rainfall was highly seasonal, so we divide models by the season of collection. Models constructed using species distribution data from the dry season used the precipitation in the driest season; models constructed using species distribution data from the wet season used the precipitation in the wettest season. These two variables were taken from the Worldclim database, as BIO13 Precipitation of Wettest Month and BIO14 Precipitation of Driest Month [17]. Flow accumulation was derived using elevation data [18]. Flow accumulation is the surface area contributing water to a particular point, and indicates the potential amount of water available, which is then determined by rainfall. Using the SRTM elevation, flow accumulation was derived using the Fill, Flow Direction and Flow Accumulation tools in ArcMap 10.1 [19]. Wetness index has previously been shown to be associated with the Buruli ulcer [9]. In ecological terms it indicates the topological potential for water to accumulate, and was derived according to Equation 1,

$$WI = \log \frac{FA \quad 500}{\tan(S)} \qquad (1)$$

where FA was the flow accumulation, 500 was the cell size in meters, and S was the surface slope in degrees. Large flow accumulation values and flat slopes resulted in high wetness index values, and indicate areas where water is likely to stagnate. In areas where the slope is zero wetness index had no value. Land cover was derived from the Global Land Cover Map 2009 [20]. GLC-At Point (hereafter GLC-AP) is the land cover at the sample site. In a 5 km radius around the site the most common (modal) land cover category was described. For example, a sample site may be in savannah, but surrounded by forest. 5 km was selected as the approximate flight radius of the insects [21-23]. This is termed GLC-5 K.

Data preparation, niche modelling, and prediction of spatial distribution of suitable habitat

Insect distribution data from the 36 sample sites (Figure 1) were explored to identify normality, homogeneity of variance and correlation in the five environmental parameters used. Two sites were excluded from analysis as apparent outliers in flow accumulation, otherwise the data were normally distributed and homogenous. Correlation was observed between flow accumulation and wetness index and between precipitation in the driest and in the wettest seasons, however this was not significant ($p > 0.05$) using a Spearman's correlation test. All data were resampled to a spatial resolution of 0.004 decimal degrees (~300 m^2) for modelling using resample() in the library 'raster' of the software R [24].

Across the scale of West Africa we assume that absence data is not reliable, as it is more likely to indicate failure of detection rather than evidence of absence. For this reason, we chose to conduct presence-only modelling, and the specific method selected was Maximum Entropy [25]. We used the software Maxent (Maxent 3.3.3 k, [25]) to construct these models. Maxent has been used several times in the past to model the ecological niche of disease vectors [26]. Maximum entropy

Table 2 Spearman's rank correlation coefficients for correlation between Buruli ulcer prevalence and habitat suitability in Akonolinga, for both seasons and species

Species	Season	Buffer	Bonferroni p value
Belostomatidae	Dry	10	-
		5	-
		4	-
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-
	Wet	10	0.000
		5	0.014
		4	0.023
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-
Naucoridae	Dry	10	-
		5	-
		4	-
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-
	Wet	10	0.001
		5	0.013
		4	0.014
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-

The column labelled Buffer is the distance, in km, around the village centre that the habitat suitability is considered, the buffer labelled village uses village boarders as a buffer (Figure 3). Bonferonni's p value is the significance of the correlation between the insect and the disease, for clarity only significant values (<0.05) are presented, non-significant values are marked "-". Significant positive correlations were observed between both Belostomatidae and Naucoridae in the wet season and Buruli ulcer prevalence, but not the dry season.

modelling minimises the divergence between the distribution of the environmental parameters and the species distribution, assuming the species is distributed in the most ecologically efficient manner possible. Maxent describes the environmental parameters across the study region, and is sensitive to the size of the study region. Herein, we generated background points in every raster cell within the extent of our study (that is, every environment was described). The models were replicated 100 times and averaged.

In order to select an appropriate extent to the area considered for modelling we chose to confine the spatial extent of our study to the region ecologically interpolated by the sample sites (Figure 2). The sample sites of the SME dataset describe a particular range of environmental conditions for the five environmental parameters (Table 1). We excluded conditions that were not studied by the SME regime (much larger or lower values of rainfall, land cover categories not sampled, flow accumulation not observed at the study sites) to avoid extrapolating beyond the range of ecological parameter values studied. To select this interpolative region we constructed a Multivariate Environmental Similarity Surface (MESS map [27]), excluding areas with negative MESS values from our study region. A MESS map was constructed for each model; models with more samples can be interpolated into larger ecological regions. MESS maps were constructed with the function mess() available in the library dismo in R.

Evaluating model performance

We evaluated the performance of these models according to their ability to correctly predict the distribution of the insects (with a separate dataset, the AG dataset) as efficiently as possible (avoiding overfitting). We used two methods to evaluate the models. First, the Akaike information criterion, corrected for small sample size (AICc), was used. AICc was generated as in [28], and penalises complex models to avoid over-fitting the data, low AICc scores indicate the model is not over-fitting. Second, we tested the models ability to predict the AG dataset. The Area Under Curve (AUC) is often used to evaluate Maxent models, and has been criticized previously [29]. We used a modified version of the AUC for model evaluation, termed here AG AUC. The model predictions were compared to the known values as collected by AG. AG AUC values range from 0 to 1, values close to 1 indicate good performance, 0.5 is no better than random. Use of the AG dataset allowed us to use true absence data for model validation, avoiding the problem of pseudo-absence data in Maxent.

The purpose of these two different metrics is to consider different aspects of performance, neither were without

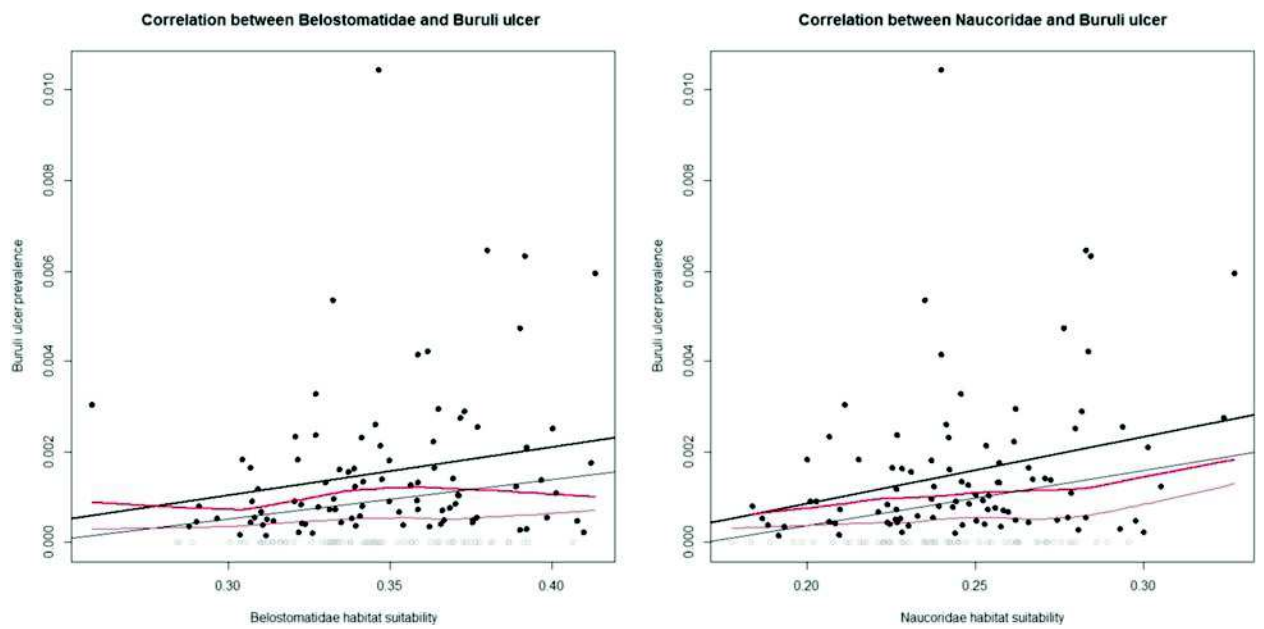


Figure 4 Correlation between the prevalence of Buruli ulcer and habitat suitability of Belostomatidae (left) and Naucoridae (right) in the wet season in Akonolinga. Colour indicates use of a linear model (Black) or locally weighted scatterplot smoothing (Red), different ways of viewing the correlation. Buruli ulcer was absent from certain villages (grey dots) where habitat suitability for the insects is high. Because this can skew any correlation between habitat suitability and prevalence, we explored the effect of including (thin lines) or excluding (thick lines) these villages. We note that in either case Spearman's rank correlation coefficient was significant. For Belostomatidae with Buruli ulcer absent villages $p = 0.08$, without BU absent villages $p = 0.03$. For Naucoridae with BU absent villages $p = 0.04$, without BU absent villages $p = 0.02$.

limitations. Use of the AG dataset allowed a degree of validation across methodologies, indicating the extent to which our results were dependent on a particular sampling regime. AICc is traditionally used to indicate overfitting in models, however it is sensitive to the size of the ecological niche of the species.

Identifying the relationship between habitat suitability and Buruli ulcer prevalence

Buruli ulcer prevalence data was collected for two endemic regions in Cameroon, Akonolinga [30] and Bankim [31], as shown in Figure 3. Around the centre of each village a buffer was created, and average habitat suitability in this buffer was correlated to the village Buruli ulcer prevalence using Spearman's rank correlation coefficient. Seven buffers were used to explore the effect of buffer size and shape. Around the centre of the village circular buffers of 1, 2, 3, 4, 5 and 10 km were selected, and average habitat suitability recorded. We also used a buffer defined by the borders of the village (Figure 3). This buffer changes in size for each village, and represents the approximate extent of the village area. 5 km is approximately the flight radius of the insects, and the distance easily walkable by local people on an average day in Akonolinga [32]. To deal with this multiple testing, Bonferonni's correction of the p-values was used.

Results

Distribution of suitable habitat, and its relationship to Buruli ulcer

In Akonolinga there was a significantly positive correlation between Buruli ulcer prevalence and average habitat suitability, for both Naucoridae and Belostomatidae, in the wet season (Table 2, Figure 4). This relationship was significant at multiple buffer distances. In contrast, in Bankim there was no significant correlation between Buruli ulcer prevalence and Belostomatidae or Naucoridae average habitat suitability, in either wet or dry seasons or at any buffer distance (Table 3).

Table 3 Spearman rank correlation coefficients for correlation between Buruli ulcer prevalence and habitat suitability in Bankim, for both seasons and species

Species	Season	Buffer	Bonferroni p value
Belostomatidae	Dry	10	-
		5	-
		4	-
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-
	Wet	10	-
		5	-
		4	-
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-
Naucoridae	Dry	10	-
		5	-
		4	-
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-
	Wet	10	-
		5	-
		4	-
		3	-
		2	-
		1	-
		Village	-

The column labelled Buffer is the distance, in km, around the village centre that the habitat suitability is considered, the buffer labelled village uses village boarders as a buffer (Figure 3). Bonferonni's p value is the significance of the correlation between the insect and the disease, for clarity only significant values (<0.05) are presented, non-significant values are marked "-". No significant correlations were observed in Bankim.

Ecologically important variables in the distribution of the aquatic insect families

Variable importance was evaluated using Jackknife variable removal. Jacknife removes a variable and evaluates the effect of variable removal on the model. In the dry season Belostomatidae and Naucoridae responded in broadly similar fashions; the variable whose removal had the largest effect was GLC 5 km (Figure 5). The land cover categories most suitable for both Belostomatidae and Naucoridae are water bodies, artificial areas, rain fed croplands and forest/grassland mosaics (Figure 6). If one of these categories is the dominant category in 5 km radius, in the dry season, the likelihood of encountering the insect is higher. Unsuitable categories were forest and vegetation/cropland mosaic.

In the wet season precipitation is more important than land cover. Precipitation suitability peaks at approximately 300 millimeters per month, and diminishes above or below this (Figure 6). For the dry season there is a simple increase in habitat suitability with increasing precipitation.

Flow accumulation had a negative association with habitat suitability, and wetness index had a positive association, regardless of season, for both Belostomatidae and Naucoridae.

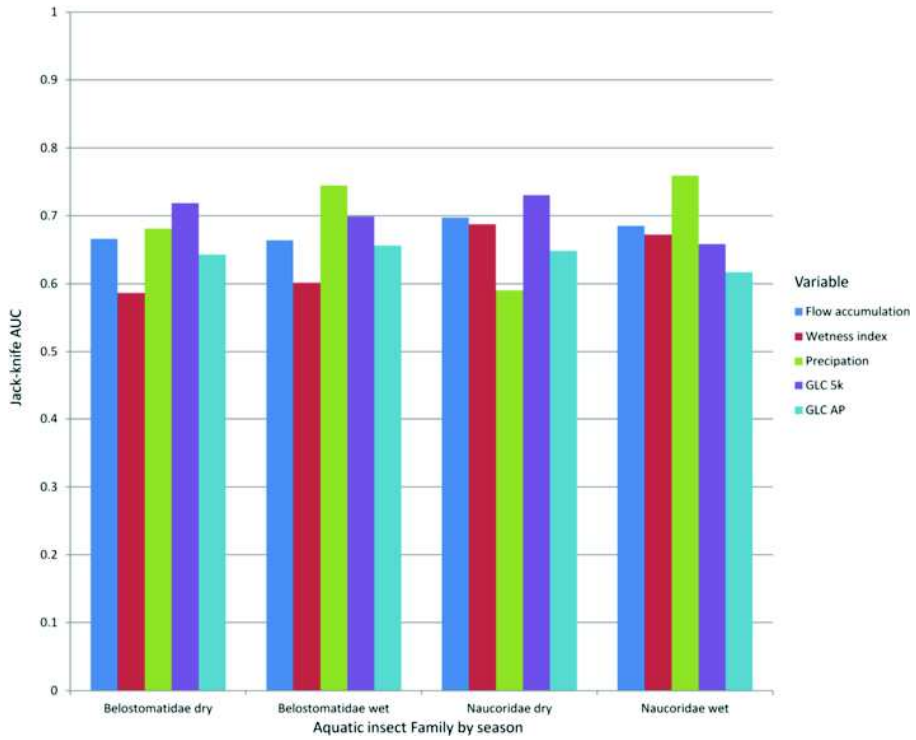


Figure 5 Importance of each variable according to Jack-knife AUC for wet and dry seasons. A high value indicates the variable is important; however this is sensitive to correlation within the variables. For both insects the most important variable in the dry season was the land cover in the flight radius (GLC 5 km), in the wet season precipitation was the most important variable.

Model performance

AICc for Naucoridae adults (dry season) was 14.6, and 14.2 in the wet season, as in Table 2. For Belostomatidae adults (dry season) the AICc was 12.5, and 12.2 in the wet season. Scores of overfitting are relative; these scores indicate the Belostomatidae model was less prone to overfitting than the Naucoridae model.

The AG data set was also used in model validation. In the dry season Naucoridae adults had an AG AUC of 0.83, and 0.80 in the wet season. Belostomatidae adults had an AG AUC of 0.80 in the dry season, and 0.86 in the wet season. These scores indicate that the models are able to describe the distribution of the insects with good accuracy; the model based on SME dataset is able to accurately replicate the independently collected AG dataset.

Discussion

We explored the correlation between the distribution of Belostomatidae and Naucoridae and the prevalence of Buruli ulcer. We have found a positive gradient between habitat suitability of Naucoridae and Belostomatidae and Buruli ulcer prevalence. Correlation does not imply causation; this result is not proof that the insects are vectors. However, understanding the reasons for the temporal and spatial changes in this correlation will enable a better understanding of the reasons for changes in Buruli ulcer prevalence.

There are significant temporal changes in this correlation between habitat suitability of the insects and Buruli ulcer prevalence; in Akonolinga the Buruli ulcer prevalence is correlated to Naucoridae and Belostomatidae distribution in the wet season, but not in the dry season. Buruli ulcer is known to have complex temporal changes in prevalence [30,33,34], as is M. ulcerans [14,35]. It is therefore unsurprising that, if these insects are implicated in maintaining M. ulcerans in the environment, or involved in transmission to humans in some way (either as host vectors, or host carriers), the correlation between Buruli ulcer prevalence and their abundance would change in time.

We also observe spatial changes in the correlation; water bug habitat suitability is not correlated to Buruli ulcer prevalence in Bankim, 457 km North of Akonolinga. Speculatively, perhaps other routes of transmission may be more important in this region, for example contact with infected plant biofilms, as suggested in Ghana [36].

How do we interpret this result in terms of the Bradford-Hill guidelines? Here in we have focused on the correlation between these insects and the prevalence of the disease in both space and time. While there is a significant positive correlation for the predicted abundance of the aquatic insects and the prevalence of the Buruli insects and the prevalence of the Buruli

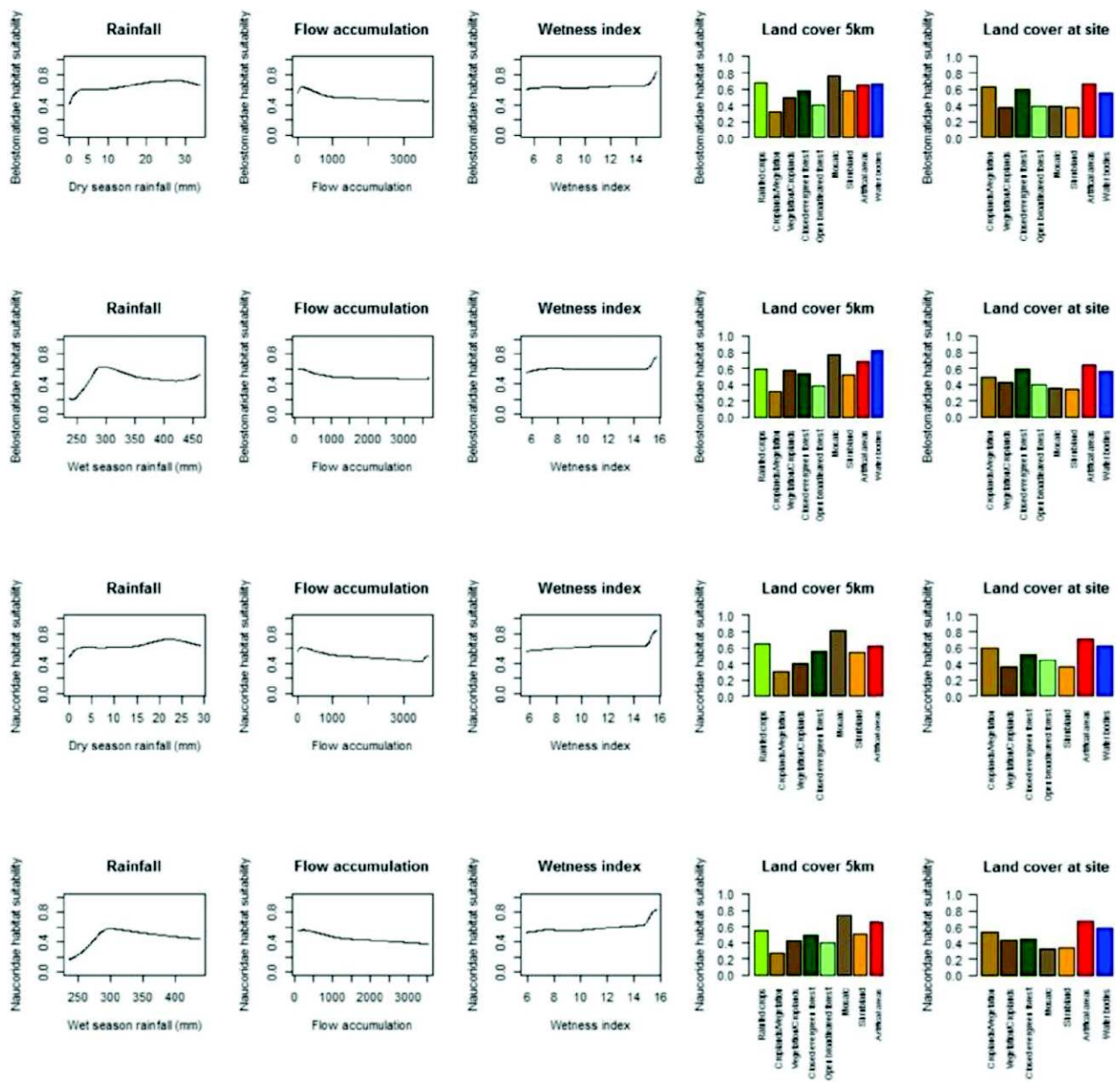


Figure 6Habitat suitability forBelostoma tidae(1st and2nd rows)andNaucorid ae(3rd and4th rows)inthewetanddryseasons. Both insectshaveanegativerelationshipwithflowaccumulation,andapositiverelationshipwithwetnessindex;anunexpectedrelationshipgiven thatincreasingflowaccumulationnormallymeansincreasingwetnessindex.

ulcer,this correlation is not consistent from region to region.Previous research has proposed that M. ulcerans is transmitted within a multi-host transmission network [4].Insuch a situation of multiple hosts the relative importance of any given mode of transmission may be expected to vary in time or space, and our results are consistent with, though not proof of, this hypothesis.

The lack of a clear signal between water bugs and Buruli ulcer in Bankim would suggest that may not be key vectors or host carriers in that region. Recent studies have found notable changes in community composition relevant to M. ulcerans distribution, in the Greater Accra, Ashanti and Volta regions of Ghana, for both plant [35] and aquatic insects [37].This would support the importance of changing biotic communities as a key factor inchanging Burul iulcer prevalence, apriority for future work. We have found that the prevalence of Buruli ulceris correlated to Belostomatidae and Naucoridae abundance in Akonolinga but not Bankim, we do not know if the plant community composition for these re- gions, and wider aquatic insect community, also correlates to diseas ze prevalence changes on a similar scale.

The ecological niches of both Naucorid and Belostomatid water bugs in West Africa are predominantly determined by the distribution of suitablel and cover in a 5 km radius, preferring water bodies, artificialareas and rainfed croplands. The specific land cover at the point of the site (GLCAP) was less in formative. The observation that the most suitable regional landcover classis water bodies is not surprising, but the high suitability of urban areas is curious.

Ecologically this could have a variety of causes; there may be changes in the chemical composition of water in these habitats, a reduction in predation pressure, oragreater abundance of food.The specific reasons will require further research.

Our study has been limited incertain points; the low taxonomic resolution of the insects is a current limitation in this study. Secondly, an important limitation is that the distribution of M.ulcerans in these insects in these areas isunknown. The distribution of Naucoridae and Belostomatidae infected by M. ulcerans may differ from the distribution of Naucoridae and Belostomatidae generally. However, the insects are known to host the bacilluson their carapace, in their body [10,14,16]) and in their salivary glands [14] in the wild, and the distribution of the insect necessarily sets alimit to the distribution of infected insects. A related limitation is the unknown incubation time of M. ulcerans; the time from infection to presentation at the hospital, remains unknown. Finally, we have only addressed a single criterion of the Brad for d-Hill guidelines; correlation. We have not aimed for a full discussion of the other criteria, and our findings should not be interpreted as proof of the role of these insects as vectors or key host carriers. Rather, we have discussed the existence of, and change in, acorrelation between these insects and Buruli ulcer. Future work aims to explore spatial variation in the correlation between Buruli ulcer and the entire plant and animal communities, identifying any similarities between re- gions where the correlation exists, expanding on previ- ous studies [37] which have focused on the community assemblage differences between M. ulcerans endemic and non-endemicr egions of Ghana.

Despite these limitations, these results are consistent with previous research, which has shown that in Akonolinga the Nyong river is a risk factor for Buruliulcer [30]. Our results agree witht his conclusion; the main focus of suit- able habitats for the insects in Akonolinga is the Nyong river, where the existence of large plants near the river banks provides appropriate habitat for Naucoridae and Belostomatidae to forage, develop and reproduce. Previous research has also implicated aquatic insects asimportant vectors in Akonolinga [14], including detection of M. ulcerans in the saliva of the insects.

In conclusion, we find a positive correlation between the abundance of Naucoridae and Belostomatidae suitable habitat and Buruli ulcer prevalence. This correlation is not constant, and changes in time and space. We interpret this as evidence consistent with that idea that Naucoridae and Belostomatidae may be locallyi mportant host carriers of M.ulcerans incertain conditions, their importance chan- ging as the environmental conditions change, which would be expected in the situation of multi-host transmission.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
KCconducted statisticalanalysisandwrotethemanuscript,SME,AG,andJL collectedspeciesdistributiondataanddiseaseprevalencedata,underthe supervisionof GT,LMandPLG.JFGandDLSconcievedtheexperimentsand revisedthemanuscript.Allauthorsreadandapprovedthefinalmanuscript.

Acknowledgements
Aninitialdraft of thispaperwasreviewedbytwoanonymousreferees, whomwesincerelythankfortheirinsightfuldiscussionsonthesubject.This workhasbenefitedfromfundingbytheLaboratoired'ExcellenceCentre d'EtudedelaBiodiversitéAmazonienne(grantANR-10-LABX-25-01),bythe YoungInternationalResearchTeamJEAIATOMyc (AIRD/IRD),andbyagrant fromtheFrench NationalResearchAgency(ANR11CEPL00704EXTRA-MU). Ourgrateful thanksarealsoextendedtothestaffoftheInstitutdeRecherche pourleDéveloppement(IRD),leCentredecoopérationinternationaleen rechercheagronomiquepourledéveloppement(CIRAD),andInstitutPasteur fordiscussionandsupportintheresearch.K.CarolanwassupportedbytheANREXTR AMUproject,LabExCEBAandJEAIATOMyc.S.Meyin ÀEbong was supportedbyaPhDstudentshipfromAIRD/IRDandtheCentrePasteurdu Cameroun,J.Landierwas supportedbyaPhDstudentshipfromInstitutPasteur, Unitéd'EpidemiologiedeMaladiesEmergentes,andD.Sanhueza,was supported byaPhDstudentshipfromBecasAgenciadeCooperación InternacionaldeChile(AGCI)andtheBIOHOPSYSprogrammefromthe LabEx-CEBA,A.GarchitorenawassupportedbyaPhDstudentshipfromthe Écoledeshautesétudesensantépublique(EHESP).

Authordetails
[1]Unitémixtederecherche(UMR)MaladiesInfectieusesetVecteurs:Écologie, Génétique,Evolution,etContrôle(MIVEGEC)IRD-CNRS-UniversitesofMontpellier IandII,CentreIRDdeMontpellier,BP64501,34394MontpellierCedex5,France. [2]UMRTerritoires,Environnement,Télédétection etInformationSpatiale(TETIS) CIRAD,34093Montpellier,France.[3]LaboratoiredeMycobactériologie,Centre PasteurduCameroun,RéseauInternationaldesInstitutsPasteur,Yaoundé, Cameroun.[4]EcoledesHautesEtudesenSantéPublique,Rennes,France.[5]Unité d'EpidemiologiedeMaladiesEmergentes,InstitutPasteur,25RueduDocteur Roux,75015Paris,France.[6]Serviced'épidémiologieetdesantépublique, Centre PasteurduCameroun,RéseauInternationaldesInstitutsPasteur,Yaoundé, Cameroun.[7]UMR912-SESSTIM-INSERM/IRD/Aix-MarseilleUniversitéFacultéde Médecine-27,BdJeanMoulin,13385Marseille,France.[8]ATOMycA,Inserm AvenirTeam,CRCNA,InsermU892,6299CNRSandLUNAM,Angers,France. [9]IRD,Institut deRecherchepourleDéveloppement,UR072,Laboratoire Evolution,GénomesetSpéciation,UPR 9034,CentreNationaldelaRecherche Scientifique(CNRS),91198 GifsurYvetteCedex,FranceetUniversitéParis-Sud 11, 91405OrsayCedex,France.

Received:2August2014Accepted:13October2014 Published:25October2014

References
1. Vander WerfTS,Vander Graaf WT,Tappero JW,AsieduK:Mycobacterium ulceransinfection. Lancet1999,354:1013–1018.
2. Veitch MGK,JohnsonPDR,Flood PE,LeslieDE,Street AC,Hayman JA:A largelocalizedoutbreakofMycobacteriumulceransinfectionona temperatesouthernAustralianisland.EpidemiolInfect1997,119:313–318.
3. Amissah NA,Gryseels S,Tobias NJ,Ravadgar B,Suzuki M,VandelannooteK, DurnezL,LeirsH,Stinear TP,Portaels F,Ablordey A,Eddyani M: Investigatingtheroleoffree-livingAmoebaeasaReservoirfor Mycobacteriumulcerans.PLoS NeglTropDis2014, 8:e3148.

4. Roche B,BenbowME,Merritt R,Kimbirauskas R,McIntosh M,SmallPL, WilliamsonH,Guégan JF:IdentifyingtheAchillesheelofmulti-host pathogens:theconceptofkeystone'host'speciesillustratedby Mycobacteriumulceranstransmission.EnvironResLett2013,8:045009.
5. Marsollier L,Robert R,Aubry J,Saint André JP,Kouakou H,Legras P, ManceauAL,MahazaC,Carbonnelle B:Aquaticinsectsasavectorfor Mycobacteriumulcerans.ApplEnvironMicrobiol2002,68:4623–4628.
6. Marsollier L,Aubry J,CoutanceauE,André JPS,Small PL,Milon G,Legras P, Guadagnini S,Carbonnelle B,Cole ST:Colonizationofthesalivaryglands ofNaucoriscimicoidesbyMycobacteriumulceransrequireshost plasmatocytesandamacrolidetoxin,mycolactone.CellMicrobiol 2005, 7:935–943.
7. Marsollier L,Brodin P,Jackson M,Korduláková J,Tafelmeyer P,Carbonnelle E,Jacques A,MilonG,LegrasP,SaintAndré JP, LeroyC,Cottin J,Guillou MLJ,Reysset G,Cole ST:ImpactofMycobacteriumulceransbiofilmon transmissibilitytoecologicalnichesandBuruliulcerpathogenesis.PLoS Pathog2007,3:e62.
8. Marsollier L,DeniauxE,Brodin P,Marot A,Wondje CM,Saint-André JP, ChautyA,JohnsonC,TekaiaF,Yeramian E,LegrasP,Carbonnelle B,Reysset G,Eyangoh S,Milon G,Cole ST,Aubry J:ProtectionagainstMycobacterium ulceranslesiondevelopmentbyexposuretoaquaticinsectsaliva. PLoS Med2007,4:e64.
9. Wagner T,BenbowME,BurnsM,JohnsonRC,MerrittRW,QiJ,SmallPL:A landscape- basedmodelforpredictingMycobacteriumulceransinfection (Buruliulcerdisease)presenceinBenin,WestAfrica.Ecohealth2008,5:69–79. 10. BenbowME,Williamson H,Kimbirauskas R,McIntosh MD, KolarR,Quaye C, AkpabeyF,Boakye D,Small P,Merritt RW:Aquaticinvertebratesasunlikely vectorsofBuruliulcerdisease.EmergInfectDis2008,14:1247.
11. HillAB:Theenvironmentanddisease:associationorcausation?Proc R SocMed1965,58:295. 12. Merritt RW,Walker ED,Small PL,Wallace JR, JohnsonPD,Benbow ME, Boakye DA:EcologyandtransmissionofBuruliulcerdisease:a systematicreview.PLoSNeglTropDis2010, 4:e911.
13. SchünemannH,HillS,Guyatt G,AklEA,Ahmed F:TheGRADEapproach andBradfordHill'scriteriaforcausation.JEpidemiolCommunity Health 2011,65:392–395.
14. Marion E,Eyangoh S,Yeramian E,Doannio J,LandierJ,AubryJ,FontanetA, Rogier C,Cassisa V,Cottin J,Marot A,EveillardM,Kamdem Y,Legras P, Deshayes C,Saint-André JP,MarsollierL:Seasonalandregionaldynamics ofM.ulceranstransmissioninenvironmentalcontext:deciphering theroleofwaterbugsashostsandvectors.PLoSNeglTropDis2010, 4:e731. 15. EbongSMA,Eyangoh S,Marion E,Landier J,Marsollier L,Guégan JF,Legall P: Survey ofwaterbugsinBankim,anewBuruliulcerendemicareain Cameroon.JTropMed2012,doi:10.1155/2012/123843.
16. GarchitorenaA, Roche B,KamgangR,Ossomba J,Babonneau J,LandierJ, FontanetA,FlahaultA,Eyangoh S,Guégan JF,MarsollierL:Mycobacterium ulceransecologicaldynamicsanditsassociationwithfreshwater ecosystemsandaquaticcommunities:resultsfroma12-monthenvironmental surveyinCameroon.PLoSNeglTropDis2014, 8(5):e2879.
17. Hijmans RJ,CameronSE,Parra JL,JonesPG,Jarvis A: Very highresolution interpolatedclimatesurfacesforgloballandareas.IntJClimatol2005, 25:1965–1978. 18. Jarvis A,Reuter HI,Nelson A,Guevara E:Hole-filledSRTMfortheglobe Version4.http://srtm.csi.cgiar.org.
19. ESRI(Environmental SystemsResourceInstitute):ArcMap10.1.Redlands, California:ESRI;2009.
20. Map GLC:USGS2009,Global Land Survey,2009,Landsat ETM+,30m scene p102r062_7dx19991002. SiouxFalls,SouthDakota: USGS;2009.
21. Bowden J:Therelationofactivityoftwospeciesof Belostomatidaeto rainfallandmoonlightinGhana.JEntomol SocSouth Af1964,26:293–301.
22. LytleDA:Useofrainfallcuesby Abedusherberti(Hemiptera: Belostomatidae):amechanismforavoidingflashfloods.JInsectBehav 1999,12:1–12.
23. Mukai Y,IshiiM:Habitatutilizationby thegiantwaterbug,Appasus (Diplonychus)major(Hemiptera: Belostomatidae),inatraditionalrice paddywatersysteminnorthernOsaka,centralJapan.ApplEntomolZool 2007,42:595–605.
24. RCore Team: R: ALanguageandEnvironmentforStatisticalComputing. Vienna, Austria: RFoundationforStatisticalComputing; 2013.URL http://www.R-project.org/.
25. PhillipsSJ,DudíkM,Schapire RE:AMaximumEntropyApproachto SpeciesDistributionModeling.InProceedingsoftheTwenty-First InternationalConferenceonMachineLearning.83rdedition;2004.
26. González C,Wang O,StrutzSE,González-Salazar C,Sánchez-Cordero V, Sarkar S:Climatechangeandriskofleishmaniasis inNorthAmerica: predictionsfromecologicalnichemodelsofvectorandreservoir species.PLoSNeglTropDis2010, 4:e585.
27. ElithJ,Kearney M,Phillips S:Theartofmodellingrange-shiftingspecies. Methods EcolEvol2010,1:330–342. 28. Warren DL,Seifert SN:EcologicalnichemodelinginMaxent:the importanceofmodelcomplexityandtheperformanceofmodel selection criteria. EcolAppl2011,21:335–342.
29. LoboJM,Jiménez-Valverde A,Real R:AUC: amisleadingmeasureoftheperformanceofpredictivedistributionmodels.GlobEcolBiogeogr2008, 17:145–151.

30. Landier J,Gaudart J,Carolan K,SeenDL,Guégan JF,Eyangoh S,FontanetA, Texier G:Spatio-temporalpatternsandlandscape-associatedriskof buruliulcerinAkonolinga,Cameroon.PLoSNeglTropDis2014, 8:e3123.
31. Marion E,Landier J,BoisierP,Marsollier L,FontanetA,LeGallP,Aubry J, Djeunga N, Umboock A,Eyangoh S:GeographicexpansionofBuruliulcer disease,Cameroon.EmergInfectDis2011,17:551.
32. Giles-Vernick T, Owona-Ntsama J,LandierJ,EyangohS:ThepuzzleofBuruli ulcertransmission,ethno-ecologicalhistoryandtheendof"love"inthe Akonolingadistrict,Cameroon.SocSciMed2014, doi:10.1016/j.socscimed. 2014.03.008.
33. MorrisA,Gozlan RE,HassaniH,Andreou D,Couppié P,Guégan JF:Complex temporalclimatesignalsdrivetheemergenceofhumanwaterborne disease.EmergMicrobesInfect2014,3:e56.
34. vanRavensway J,Benbow ME,Tsonis AA,PierceSJ,Campbell LP,Fyfe JA, Hayman JA,JohnsonPDR,Wallace JR,QiJ:Climateandlandscapefactors associatedwithBuruliulcerincidence inVictoria,Australia.PLoSOne 2012,7:e51074.
35. McIntosh M, Williamson H,Benbow ME,Kimbirauskas R,Quaye C,Boakye D, Small P,Merritt R:AssociationsbetweenMycobacteriumulceransand aquaticplantcommunitiesofWestAfrica:implicationsforBuruliulcer disease.Ecohealth2014,11:1–13.
36. Merritt RW,BenbowME,Small PL:Unravelinganemergingdisease associatedwithdisturbedaquaticenvironments:thecaseofBuruliulcer. FrontEcolEnviron2005,3:323–331.
37. BenbowME,Kimbirauskas R,McIntosh MD,Williamson H,Quaye C,Boakye D,Smqll P,Merritt RW:Aquaticmacroinvertebrateassemblagesof Ghanam,WestAfrica:understandingtheecologyofaneglectedtropical disease.Ecohealth2013,11:1–16.

doi:10.1186/1476-072X-13-44
Citethis article as:Carolanetal.:Ecologicalniche modellingof Hemipteraninsects inCameroon; the paradoxofavector-borne transmissionforMycobacteriumulcerans,the causative agentofBuruli ulcer.InternationalJournalofHealthGeographics201413:44.

Submit your nextmanuscript to BioMedCentral and take full advantageof:

- Convenientonlinesubmission
- Tho r oughpeer review
- Nospaceconstraints orcolor figu r echarges
- Immediatepublication on acceptance
- Inclusion inPubMed, CAS,Scopus and GoogleScholar
- Resea r chwhich isfr eelyavailable forredistribution

Submityourmanuscript at ww w.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

ISSN1175-5326(printedition)
Zootaxa3779(5):573–584

www.mapress.com/zootaxa/Article ZOOTAXA

ISSN1175-5334(onlineedition)

Copyright©2014Magnolia Press

A taxonomic synopsis of Limnogeton Mayr,1853 (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae)

JOSÉRICARDO I. RIBEIRO[1], SOLANGE E. MEYIN-A-EBONG[2], PHILIPPE LE-GALL[3] & ERIC GUILBERT[4]

[1]Universidade Federaldo Pampa, Campus São Gabriel. Avenida Antônio Trilha1 847. Centro, São Gabriel R S, Brasil. CEP 97300-00. E-mail: joseribeiro@unipampa.edu.br.

[2]Service de Mycobactériologie, Centre Pasteur du Cameroun, Cameroun- Réseau International des Instituts Pasteur, BP 1274 Yaoundé, Cameroon. E-mail: solange.meyinaebong@ird.fr.

[3]Institut de Recherche pour le Développement (IRD, UR072 BP 1857), Yaoundé, Cameroon. Laboratoire Evolution, Génomes et Spéci-ation, UPR 9034, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 91198 Gif sur Yvette Cedex, France et Université ParisSud 11, 91405 Orsay Cedex , France. E-mail:philippe.le-gall@ird.fr.

[4]Muséum national d'Histoire naturelle, Département Systématique et Evolution, UMR 7205 CNRS, CP 50-57 rue Cuvier, 75005 Paris, France. E-mail: guilbert@mnhn.fr.

Abstract

The Afrotropical Belostomatidae fauna has long proved to be a difficult taxonomic problem, not so much for the over-whel mingly large number of species involved but rather because of a lack of trained specialists. The rarity of some taxa also contributes to confusion, because some species remain poorly described or are known only from one or two speci-mens. Duringavisit to the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France and the Musée Royal de l'Afrique Cen-trale, Tervuren, Belgium, it was possible to comprehensively review the Limnogeton species based mainly on the specimens housed in the a forementioned collections. An updated key to a dults of all species presently included in the genus, particularly based on male genitaliacharacters studied during the present study, has been provided.

Keywords: Aquatic insects, Giant water bugs, taxonomy, male genitalia, Clinal variation

Introduction

The Belostomatidae are an aquatic heteropteran insect family of almost world wide distribution. This family contains the larges to fall Heteroptera (measuring around 150 mm), and its members are of ten referred to as electric-light bugs in some parts of the world because they are attracted to lights during the night (McGavin1993). Most species are probably generalist predators (Schuh & Slater 1995), although several species are known to prey on snails during the larval and adult stages (Armúa-de-Reyes & Estévez 2006). Lauck & Menke (1961) recognized three subfamilie scomprising nine genera (but currently eleven according to Estévez & Ribeiro 2011) and about 150 species (Mc Gavin 1993; Schuh & Slater 1995), based mainly on the genitalic features.

The genus Limnogeton Mayr, 1853 contains the only apparently obligate fresh water snail predators (Voelker 1968) and comprises four extant species (Poisson 1949). The following described species are known to occur in the northern part of Africa, extending west ward to Cameroon and south ward to Tanganyika and the Republic of Congo (Poisson 1949; Linnavuori 1971): Limnogeton expansum Montandon, 1896, L. hedenborgi (Stål,1854), L. fieberi Mayr, 1853, and L. scutellatum Mayr, 1863. Of these, L. fieberi and L. scutellatum are also known to occur in the Palaearctic Region (Polhemusetal. 1995).

Inspite of resembling Hydrocyrius in having the phallosoma dorsally bifurcated (see Lauck & Menke 1961; Estévez & Ribeiro 2011), members of Limnogeton can be readily distinguished from those of Hydrocyrius by the following characteristics: (1) fore femur with a single, flat groove for reception of the tibia; (2) fore tarsus with segments 2 and 3 equal in length and twice as long as wide; (3) fore tibiae and fore tarsi subcylindrical; (4) hind trochanter with a spiniform process directed posterolaterally (J. R. I .Ribeiro unpubl.data); and (5) posterior margin of genital operculum of females completely fringed with hairs.

The exact number of species of Limnogeton depends on how the limits between one and anothers pecies are defined in Belostomatidae. In Belostoma, for instance, delimiting species can be extremely difficult because of the cryptic scenario found in the taxonomy of its species (see Ribeiro 2007). The species-level taxonomy of several groups is generally acknowledged to be problematic. For example, we have considered that the'alpha taxonomy of bifoveolatum group is presently very unsatisfactory', although at tempts to differentiat species in bifoveolatum group have been presented using Geometric Morphometric as a tool to under stand the evident variability in male genitalia (F. Stefanello and J. R. I. Ribeiro unpubl.data). There sults indeed demonstrate both sexual selection and species isolation mechanisms acting on those species.

Although the general body shape and color make the members of Limnogeton easy to recognize in the field, Such traits are quite superficial and variable. Infact, they have little value in a phylogenetic sense. A saresult, Limnogeton is largely delimited on the basis of simple siomorphies (J. R. I. Ribeiro in prep.

Poisson made numerous contributions to the taxonomy of the Afrotropical aquatic Heteroptera fauna, including Belostomatidae (Poisson 1947, 1949, 1952, 1954, 1968a, 1968b, 1969; Poisson & de Sallier- Dupin 1970). More specifically, this author in 1949 re-described all the previously described Limnogeton and Hydrocyrius species and provided an important key to them, using new taxonomic characters. Since Poisson's works, nothing concerning the taxonomy of this Old World genus has been published. The classification and species concept in Limnogeton have there fore been based on Poisson's concepts. The rarity of some taxa contributes to confusion, with some species remaining poorly described or known from only one or two specimens. As a result, the Afrotropical belostomatid fauna has long proved to be a difficult taxonomic problem, not so much for the over whelmingly large number of species involved but rather because of a lack of trained specialists and adequate collections.

Most of the species in Limnogeton are housed in the collections in Europe (for example, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France—MNHN and Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, Belgium—MRAC),and there is no comprehensive list of the Belostomatidae material heldin these collections.Part of the hemipterological collection of Poisson is preserved in the MNHN. It also includes types of the species originally describedby Fabricius (1803), Mayr (1853, 1863, 1871), Montandon (1907), and Stål (1854, 1865), along with other specimens, and it was partially catalogued byPolhemus et al.(1995).

In July 2011 during a visit to the MNHN in Paris and the MRAC in Tervuren, it became clear that the aforementioned genera are abundantly well represented there in. Of the known Limnogeton species, all have been found in the material housed in these museums. In addition, part of the examined material has been collected by one of the authors, which has also improved this work. All Limnogeton specie sare therefore re-described here in, including in formation on the previously unknown a legenitalia. Additionally, study of specimens from Ivory Coast, Senegal and Uganda resulted in an improvement of our knowledge of the taxonomy of L.hedenborgi.

This work represents a comprehensive taxonomic revision of Limnogeton species based mainly on the specimens of Afrotropical giant water bugs found at the collection of the MNHN and MRAC. As it is difficult to obtain systematic literature concerning this fauna, akey modified after Poisson (1949) is given.The modification consists primarily of incorporating information on the previously unknown male genitalic characteristics.

Material andmethods

The results presented here in are based mainly on specimens deposited in the MNHN (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France); MRAC (Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, Belgium); and the N. Nieser collection (NC). In addition, a few specimens were collected by Solange Meyina ebong (SM); these are deposited in her personal collection. ISNB (Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Brussels, Belgium), NHMW (Natur historisches Museum Wien, Vienna, Austria), and NHRS (Natur historisk a Riksmuseet, Stockolm, Sweden) are acronyms presented only in the type data.

In quotations of label data, a comma separates different in formation and a period mark separates in formation on different specimens. The fullcitation of individual specimens collected at the same locality on different dates is notcited. A semicolon separates different specimens with same information. Insect collection institutions and collectors are cited inside parentheses. The letter "m" refers to male specimens and the letter "f" to female ones. All the localities are organized by north to south order.

Morphological terminology follows mainly Poisson (1949), except for the male genitalia, which follows Lauck & Menke (1961). Techniques for preparation of genital structures are those of Ribeiro (2007).The dissected parts ares to redinmicrovials with glycerin. Drawings and photos are based on photographs and pencils ketches made during the visit to MNHN.

Results

Redescription of Limnogeton species

Genus Limnogeton Mayr, 1853

Limnogeton Mayr, 1853:15. Type species by monotypy: Limnogeton fieberi Mayr, 1853. Borborotrephes Stål, 1854:239. Type species by monotypy: Borborotrephes hedenborgi Stål, 1854(syn. By Mayrin 1863).

Diagnosis. Length of suture anteclypeus-maxillaryplate longer than suture anteclypeus-lorum; maxillaryplate compressed; anteoculus longer than interoculus; clypeusnotreaching ocularline (0.3–1.0mm); segment I of beak shorter than II. Fore femur with a single, flat groove for reception of the tibia; foretarsus with segments 2 and 3 equal in length and twice as long as wide; fore tibiae and fore tarsi subcylindrical; hindtrochanter with a spiniform process directed posterolaterally; pubescence off ourthventrallatero tergites at taining external margin along its entirelength;armsofphallosomascarcelydeveloped, orshort;genitaloperculum offemales roundedatapexand fringed with hairs along its posterior margin, never bearing two tufts of setae.

Limnogeton expansum Montandon, 1896
(Figs.1A–E)

Limnogeton expansum Montandon,1896: 519.
Limnogetone xpansum: Poisson (1949): 7.
Limnogeton expansum: Linnavuori (1971):356.

Types. Limnogeton expansum was described based on a holotype from Tanganyika (Democratic Republic of Congo), Africa, deposited in ISNB according to Montandon (1896).

Material examined. CONGO. Brazzaville, ["393"], ["92"], 1892, (Dybowsky), identifiedas L. expansumby A.L. Montandonin 1899, J. R. I. Ribeiro det. 2011:1f (MNHN); Haute-Sanga, (P.A.Ferrière106-97):1m (MNHN). CAMEROON. Batouri, M .[?] deLisle, "MUSÉUMPARIS//P.LepesmeR.Paulian//A. Villiers, 1939, '42'", J.R.I. Ribeiro det.2011, (identifiedas L.fieberi): 2 m (MNHN).

Distribution.Tanganyika (Democratic Republic of Congo) and Kilimandjaro (Tanzania) (Poisson 1949; Linnavuori1971). This species is newly recorded here in from Batouri (Cameroon) and Brazzaville and Haute-Sanga (Congo).

Measurements (m/f): Total length (from apex of head to apex of abdomen at rest): 50.0–57.2/54.1; greatest width of body:24.0–27.2 /26.5.

General coloration. Almost uniformly brown. Body ovate with wings covering abdomen.

Head,thorax,and abdomen. Pronotum with longitudinal median carina (Fig. 1A,LMC) extending only onto posterior portion; prosternal keele longate and slightly directed anteriorly at apex, straight, robust, cylindrical, with its apex acute, slightly projecting anteriorly (Fig. 1B,PC). Pilosity developed, covering half of connexivum, slightly constricted between spiracles, not extending posteriorly along genital operculum (Fig.1C, PIL).

Male genitalia: Parameres symmetrical, both with apex curved and poorly hooked ;left one strongly edentate, The other smoothly curved; length of phallotheca about 1.4 times ventral diverticulum indorsal view; ventral diverticulum robust; dorsal arms of phallotheca strongly divergent, symmetrical, connected or fused along basal portion, V-shaped and abruptly arrowed at apex in dorsal view (Fig. 1D); lateral outer margins of ventral diverticulum almost straight (Fig. 1E), ventral diverticulum with anterior margins broader, becoming narrow posteriorly (Fig.1E).

Taxonomic notes. Males of this species can be readily distinguished from the other species of Limnogeton by having the dorsal arms of ventral diverticulum robust, V-shaped, and conspicuously acute at the apex (Fig.1D).

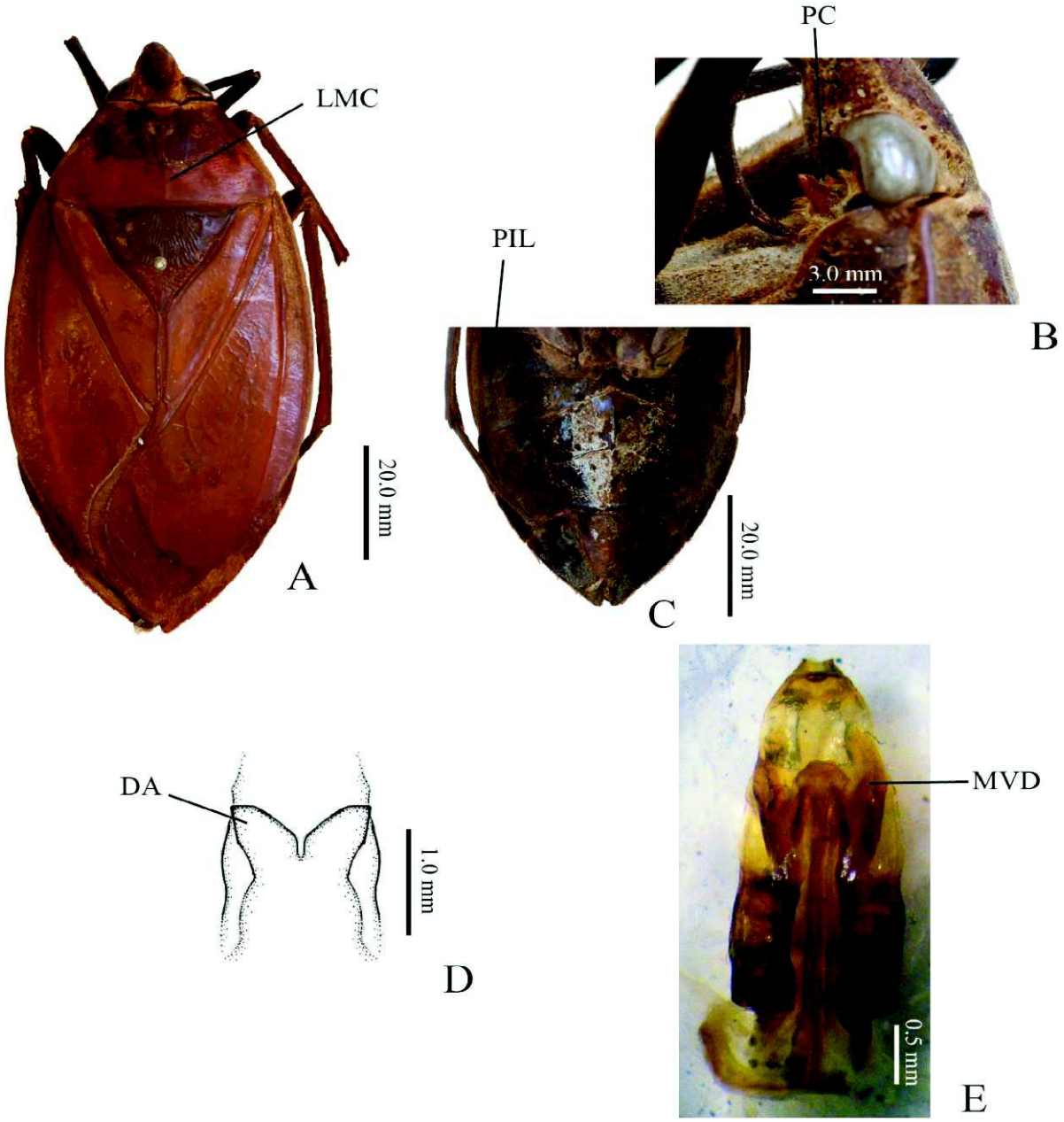


FIGURE 1.Limnogeton expansum Montandon, external morphology and male genital structures. 1A, Dorsal habitus showing pronotum with longitudinal median carina.1B,Headshowing prosternal carina, lateral view. 1C,Ventral aspect of abdomen showing development of pilosity which covers half of connexivum. 1D–E, Male genital structures: 1D, Dorsal apical membranous processes arising from phallotheca.1E,Ventral diverticulum of phallosoma showing anterior margins, ventral view. LMC, longitudinal median carina; MVD, margins of ventral diverticulum; PC, prosternal carina; PIL, pilosity of connexivum.

Limnogeton fieberiMayr, 1853
(Figs.2A–D)

Limnogeton fieberi Mayr, 1853:16.
Limnogeton fieberi: Montandon (1896):517.
Limnogeton fieberi: Poisson (1949): 7.

Limnogeton fieberi: Poisson (1954): 12.
Limnogeton fieberi: Linnavuori (1964):334.
Limnogeton fieberi: Poisson (1967): 1324.
Limnogeton fieberi: Poisson (1968a): 26.
Limnogeton fieberi: Poisson (1969): 16.
Limnogeton fieberi: Linnavuor i(1971): 355 (inpart).

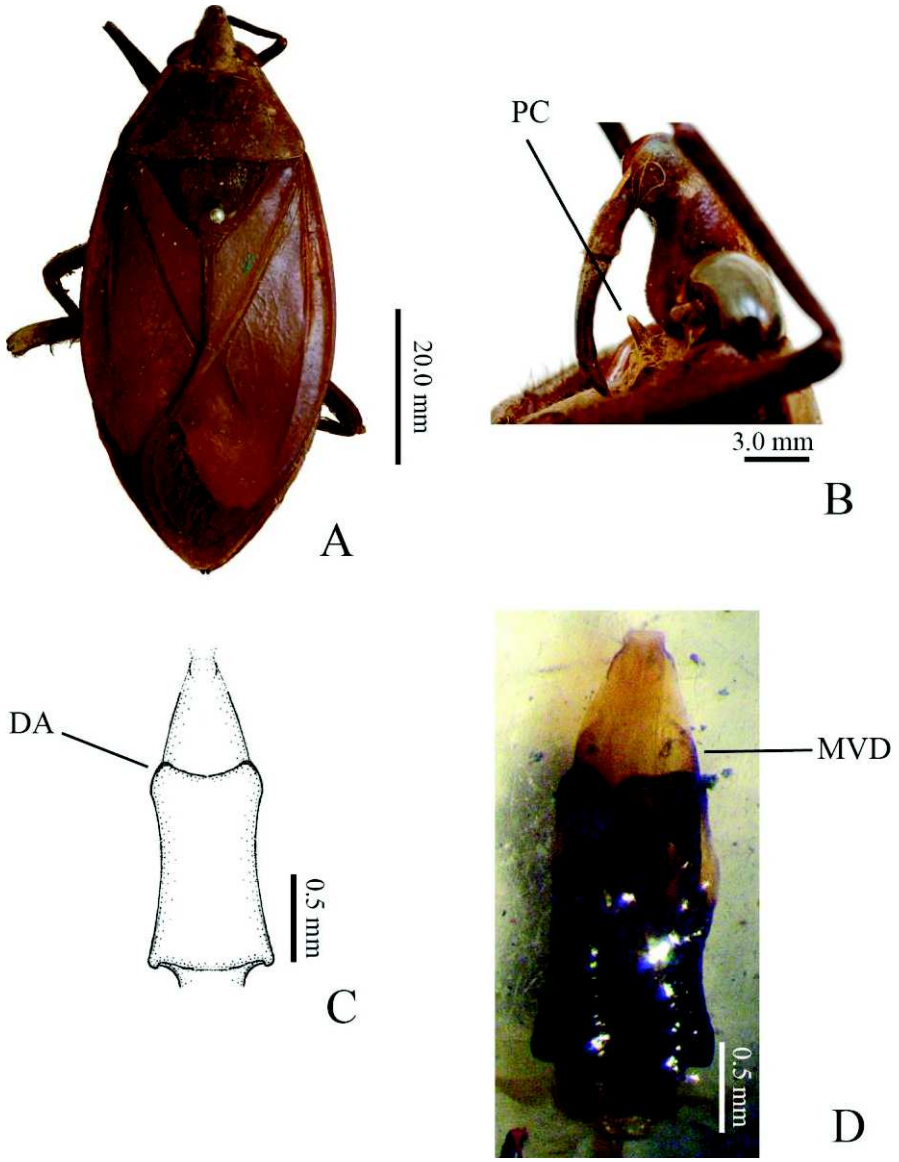


FIGURE2. Limnogeton fieberi Mayr, external morphology and male genital structures. 2A, Dorsal habitus showing pronotum with longitudinal median carina. 2B, Head showing prosternal carina, lateral view. 2C–D, Male genital structures: 2C, Dorsal apical membranous processes arising from phallotheca. 2D, Ventral diverticulum of phallosoma showing anterior margins, ventral view. L M C, longitudinal median carina; MVD, margins of ventral diverticulum; PC, prosternal carina.

Types. Limnogeton fieberi was described based on a male holotype (from Mayr's collection) from Kordofan, Sud an according to Mayr (1853), probably deposited in NHMW. This specimen was not examined.

Materiale xamined. Marno. [?], Wadai, IV.1882, ["MUSEUMPARIS//MUSEUM VIENNE1899"]: 1m (MNHN). EGYPTE. 1880, (Letourneux), J.R.I. Ribeiro det. 2011, A.L. Montandon det.1899:3f (MNHN). SUDAN. I.1863, (Penty), A.L .Montandon det.1899, J.R.I. Ribeiro det.2011:1f (MNHN). CAMEROON. [Museum E.A.C.],1950, (P. Malzyleg.), J.R.I. Ribeiro det.2011:1f (MNHN); Garoua, 2012, (Meyin), S.E. Meyin det.2013:1mand2f (SM).CONGO. N.Rhodesia, Kinge, 18.I.1938, (H.J.Brédo) [R.DET.7123A, COLL. MUS. CONGO]: 1 m (MRAC).

Distribution. Mabwe, Upemba (Democratic Republic of Congo) (Poisson 1954); Kordofan (Sudan) (Poisson

1967), Egypt (Mayr 1871; Linnavuori 1964; Poisson 1967), Cameroon, Central African Republic, Palestine (Poisson 1967); Brazzaville (Congo) (Poisson1967); Bangweulu Lake [as Région du Lac Bangweolo] (Samfya, Zambia), Région de la Kafubu (Lubumbashi, Democratic Republic of Congo) (Poisson 1968a); Luanza (Kaluko River, Zambia) (Poisson1969).

Measurements (m/f): Total length (from apex of head to apex of abdomen at rest): 40.6–55.9/45.0–53.0; Greatest width of body:18.2–25.7 /19.5–23.1.

General coloration.Almost uniformly brown. Body ovate, with wings covering ompletely abdomen.

Head, thorax, and abdomen. Pronotum with longitudinal median carina usually developed on posterior portion; prosternal keel elongate and cylindrical, strongly spiniform, with apex acute (Fig. 2B, PC). Pilosity poorly developed, covering almost half of connexivum, slightly constricted between spiracles, not extending posteriorly along genital operculum (see Fig. 3C, compare with Fig.1C).

Male genitalia: Parameres symmetrical with apex curved, directed up ward, not edentate, smoothly curved; length of phallotheca about twice ventral diverticulum in dorsal view; ventral iverticulum not robust; dorsal arms of phallotheca poorly developed and poorly connected or fused along basal portion, rounded at apex, never U- shaped (Fig. 2C, DA); lateral outermargins of ventral diverticulum straight, not sinuous (Fig. 2C); ventral diverticulum with anterior margins not strongly sclerotized, narrower, obviously convergent posteriorly in ventral view (Fig. 2D, MVD).

Taxonomic notes. Members of this species are now thought to comprise part of as trange morphocline, including L. expansum and L. scutellatum, for we have always found forms with the dorsal arms of phallotheca short and never V-shaped in L. fieberi (Fig.2C), where as they are either somewhat or quite long in L. scutellatum and L. expansum, respectively (Figs.1D, 5C). This morphological continuum seems to be linked to body size, since males of L. expansum have the dorsal arms extremely V-shaped, divergent, and more promimently developed. By contrast, L. fieberi is the smallest species of this genus and bears dorsal arms that are much shorter.

Limnogeton hedenborgi (Stål,1854)
(Figs.3–4)

Borborotrephes hedenborgi Stål, 1854: 240.
Limnogeton hedenborgi: Mayr (1863): 360.
Limnogeton fieberi: Mayr (1871):431 (necMayr).
Limnogeton hedenborgi: Montandon (1896):517.
Limnogeton hedenborgi: Poisson (1949):7.
Limnogeton expansum: Poisson (1949):9(inpart)(necMontandon).
Limnogeton hedenborgi: Poisson (1954):12.
Limnogeton hedenborgi: Poisson (1967):1324.
Limnogeton fieberi: Poisson (1968a): 26.
Limnogeton hedenborgi: Poisson (1969):16.
Limnogeton fieberi: Linnavuori (1971):355 (inpart).
Limnogetone xpansum: Linnavuori (1971):356 (in part).

Types. Limnogeton hedenborgi was described based on a holotype which was labeled as being from Egypt (according to Stål1854),deposited in NHRS.This specimen was not examined.

Material examined.[?].“Place” Kusodaso,“Date” 23.III.1955,“Host ---”,“2582”, N. Nieser det.1976 [asL. scutellatum], J.R.I. Ribeiro det.2013 [asL. hedenborgi]: 1f (NC). SENEGAL. Kolda, 05.II.1981, (B.Sigwalt “leg.”), J.R.I. Ribeiro det.2011:1f (MNHN).EGYPTE. 1880, (Letourneux), J.R.I. Ribeiro det. 2011,A.L. Montandon det.1899: 2f (MNHN); identified as Borborotrephes hedenborgi by H.Lucasdet.: 1f (MNHN);Suez, XI.1868:1f (MNHN); (Letouneux 66-96):1f (MNHN); (Noualhiercoll. 1898), identified as Borborotrephes hedenborgi:1f (MNHN).CAMEROON. Garoua, 2012, (Meyin), S.E. Meyin det.2013:1f (SM); Yaoundé, 1975- 1986, (Gaétan Mollerleg.), J.R.I. Ribeiro det.2011:1 f(MNHN). IVORY COAST. Bouaké, 09.VIII.1969, [Ioc?], (D. Duviard “Rec.”), J.R.I. Ribeiro det. 2011: 1f (MNHN). DEMOCRATIC REPUBLIC OF CONGO. “Congo Belge”, [P.N.G.], Miss. H. deSaeger, [I/b/2”],29.II.1950, [Réc.G.Demoulin.364], [witheggs ondorsum]: 1m (MRAC); [II/Je/13], 11-V-1951, Réc.P. Schoemaker 1782:1m (MRAC); Katanga, Kapanga,V.1933, (G.F. Overlaet), [R.DET.7123A, COLL.MUS. CONGO], J.R.I. Ribeiro det. In 2013: 2f (MRAC); Sandoa, XI. 1931, (G.F.Overlaet) [R. DET.7123A, “MUSÉEDU CONGO”]: 1f (MRAC); Tanganyika, Mpala, Oberthür, [“9898”],

identified as L. fieberi by A.L. Montandon 1899, J.R.I. Ribeiro det. in 2011:1m (MNHN). UGANDA.Victoria Nyanza, Ukerewe,VIII.1938, (R.P. Conrads) [R.DET.7123, COLL. MUS. CONGO], J.R.I. Ribeiro det. in2013: 1f (MRAC) [20]. CONGO. N. Rhodesia, [Kiengeor Klenge?], 18.I.1938, (H.J. Brédo) [R. DET. 7123A,COLL. MUS.CONGO], J. R.I.Ribeiro det. in 2013: 1 m (MRAC).

Distribution. Mabwe, Upemba (Democratic Republic of Congo) (Poisson 1954); Sudan, Egypt, Cameroon, central Africa, and Palestine; Brazzaville (Congo) (Stål 1854, Poisson 1967); Bangweulu Lake [as Région du Lac Bangweolo] (Samfya, Zambia), Région de la Kafubu (Lubumbashi, Democratic Republic of Congo) (Poisson 1968a); Luanza (Kaluko River, Zambia) (Poisson 1969).This species are here in newly recorded from Bouaké (Ivory Coast), Kolda (Senegal), and Victoria Nyanza (Uganda).

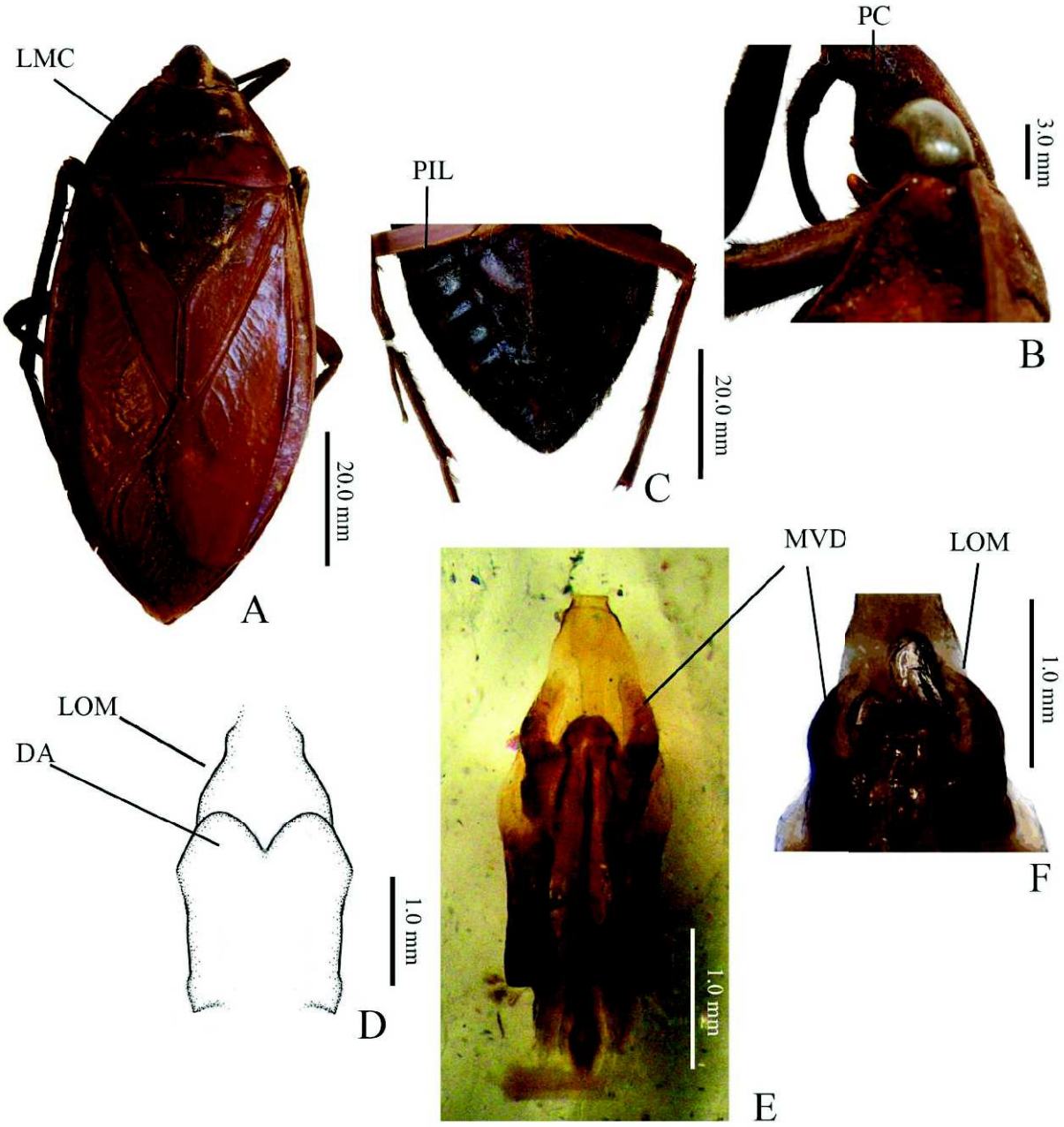


FIGURE 3.Limnogeton hedenborgi (Stål), external morphology and male genital structures. 3A, Dorsal habitus showing pronotum with longitudinal median carina.3B, Head showing prosternal carina, lateral view. 3C, Ventral aspect of abdomen showing poorly developed pilosity covering almost half of connexivum. 3D–F, Male genital structures: 3D, Dorsal apical membranous processes arising from phallotheca.3E–F, Ventral diverticulum of phallosoma showing anterior margins, ventral view. DA,dorsal arms of phallotheca; LMC, longitudinal median carina; LOM, lateral out ermargins of ventral diverticulum; MVD, margins of ventral diverticulum; PC, prosternalcarina; PIL, pilosity of connexivum.

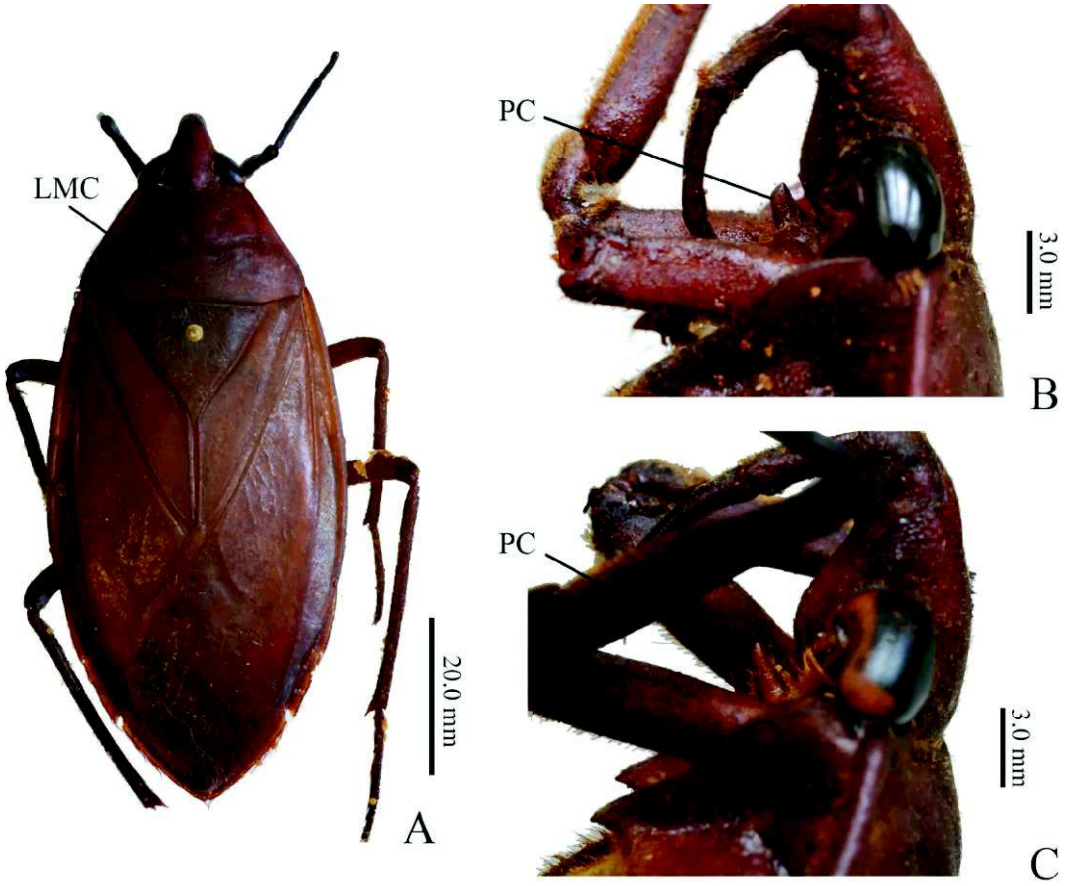


FIGURE 4 .Limnogeton hedenborgi (Stål), external morphology. 3A, Dorsal habitus showing pronotum with longitudinal median carina. 3B–C, Head showing prosternal carina, lateral view: 3C, Female specimen from Egypt. 3D, Female specimen from Senegal. LMC, longitudinal median carina; PC, prosternal carina.

Measurements (m/f): Total length (from apex of head to apex of abdomen at rest):52.0–57.9/48.0–60.5; Greatest width of body:25.0–27.3 /21.5–27.2.

General coloration. Almost uniformly brown. Body ovate with wings either covering or not covering abdomen.

Head, thorax, and abdomen. Pronotum with longitudinal median carin ausually developed only on posterior portion (Fig. 3A, LMC); prosternal keele longate and cylindrical, spiniform, usually robust, with apex truncate or obtuse (Figs. 4B– C),s ometimes projecting anteriorly (Fig. 4B, BC). Pilosity poorly developed, covering almost half of connexivum (a sFig. 3C), slightly constricted between spiracles, not extending posteriorly along genital operculum.

Malegenitalia: Parameres symmetrical with distal section curved, directed upward, strongly curved near to apex, with small hook; length of phallotheca about 1.80 times ventral diverticulumin dorsal view; ventral diverticulum robust; dorsal arms of phallotheca directed parallel, not divergent, symmetrical, not connected or fused along basal portion, poorly associated with each other, U-shaped, rounded, not gradually narrowing at apex (Fig. 30D, DA); ventral diverticulum with anterior margins strongly sclerotized, broader, somewhat parallel posteriorly in ventral view (Fig.3E,MVD); lateral out ermargins of ventral diverticulum sinuous (Fig. 3E–F, LOM).

Taxonomic notes. Mayr (1871) and Linnavuori (1971) argued that L.hedenborgidoes not seem to differ from L. fieberi in body shape. Based on Poisson's (1949) study of external characteristics, L.fieberi can other wise be distinguished from L. hedenborgi by (1) its female genital operculum rounded apically and (2) as lender body whose length is about 2.4 to 2.5 times its width in dorsal view. Infact, L. hedenborgi was also used as a valid name by Poisson (1947, 1949, 1952, 1954, 1968a, 1968b, 1969) and Poisson & deSallier-Dupin (1970), even though they had neither seen Mayr's specimens nor had any idea of its true specific identity. Conversely, according to Linnavuori (1971), L. fieberi has the female genital operculum variable in shape (especially at apex) in the Egyptian series, and the shape of male styli is also variable.

Members of this species may be mistaken lyke yed out to L. expansumin Poisson's (1949) key to Limnogeton species. In the key, the author distinguishes both L. expansum and L. scutellatum from the other species on the basis of body size, which is no more than twice the greatest width of body in these species. In addition, L.

expansum is always 50.0mm long where as L. scutellatum is smaller than 50.0mm. Never the less L. hedenborgi can be easily separated from other Limnogeton species by it's a edeagal morphology, being the only Limnogeton species with robust,more rounded dorsal arms and having the ventral diverticulum with its lateral margins sinuous, in part because of its sclerotized border sare easily seen inventral view (Figs.3E–F).

In the Poisson's (1949) key to African species, some L. fieberi specimens keyed out as L. hedenborgi, especially because of their body size. In addition,there is some variation in the prosternal carinae of female specimensfromEgyptandSenegal, althoughthisprosternalcarinaisalwaysrobust.Afemale fromSenegalbears the prosternal carina slightly more curved than that of the female from Egypt (Figs.4B–C), which is straight. Given that the prosternal carina in Limnogeton seems to be also linked to body size, a sexual size dimorphism in this genus might lead to some misunderstandings concerning reliable identifications both in L.fieberi and L. hedenborgi. It would therefore not be unlikely to identify some females of L. fieberi as L. hedenborgi, because females are usually bigger than males in Limnogeton (J.R.I.Ribeiro,unpubl. data), and have variable development of their prosternal carina. Despite this, the shape of prosternal carina in L. hedenborgi still seems to be distinctive enough to be used as are liable characteristic distinguishing both species. Limnogeton hedenborgi specimens bear cylindrical prosternal keels, usually robust, with the apex truncate or obtuse (Figs. 4B–C), where as L. fieberi specimens bear prosternal keels that are strongly spiniform, with the apex acute (Fig. 2B). Weare consequently confident in not synonymizing these species.

Limnogeton scutellatum Mayr, 1863
(Figs.5A–D)

Limnogeton scutellatum Mayr, 1863:361.
Limnogeton scutellatum: Mayr (1871):431.
Limnogeton scutellatum: Poisson (1949):7.
Limnogeton scutellatum: Linnavuori (1971):356.

Types. The species was described based on a holotype of unknown gender (Africa), deposited in NHMW, according to Mayr (1863) and Montandon (1896).

Material examined.EGYPT [?,seeabove]. 1880, (Letourneux), J.R.I. Ribeiro det. 2011, A.L. Montandon det.1899:2 mand 1f (MNHN).ETHIOPIA.1971,(G.deRougemont),J.R.I.Ribeiro det.2011:1f (MNHN). CAMEROON. Garoua, 2012, (Meyin), S.E.Meyin det.2013:3 mand 1f(SM); Yagoua, 02. VIII.1971, (F. Puylart), J.R.I.Ribeiro det. In 2013: 1m (MRAC). GHANA. No38, "EndródiSebo", ex. Mus. Budapest, N. Nieser det.1970:1m (NC). CENTRAL AFRICAN REPUBLIC. Lamaboké, 08.VIII. 1966, (R.Pujol), J.R.I. Ribeiro det. 2011 (identified as L. fieberi): 1m (MNHN). DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO. Molindi River, Albert National Park,"Kib., 1000" [?], "30–14/",02.V.1934,(G.F.deWitte): 1m (MRAC); 02.V.1934,R. Poissondet. in1945: 1f (MRAC) [391]. CONGO. Brazzaville, V.1959, (L.Vincent), J. R.I.Ribeiro det. 2011:2 f (MNHN).
ZAMBIA. Muliba, Stanley Pool,25.IX.1957, (Bula-Matori),[Coll. Mus.Congo], R.Poissondet.1959:
1f (MRAC).Prov.Nyonga, V.1925,(G.F.deWitte), J.R.I.Ribeiro det. In 2013:1m (MRAC) [witheggson dorsum];1 f(MRAC).

Distribution. Limnogeton scutellatum has been reported from Africa ("aus Afrika", Mayr 1863:361), Egypt (Poisson1 949), Zambia (Molindi River) (Poisson1949) and White Nile ('Nil Blanc", Poisson 1949:7); thelatter locality is not particularly precise because it refers to a region comprising at least five countries. In addition, Congo (Poisson 1949) is now known as Democratic Republic of the Congo and Republic of the Congo,which left the range of L. scutellatum in doubt. As argued in Polhemusetal. (1995), Linnavuori (1971) believed that Poisson's (1949:7) reference to "Égypte" for this species refers to Sudan in the former Anglo-Egyptian Sudan. This species are here in newly recorded from Garoua and Yagoua (Cameroon), Lamaboké (Central African Republic), Ethiopia, and Ghana.

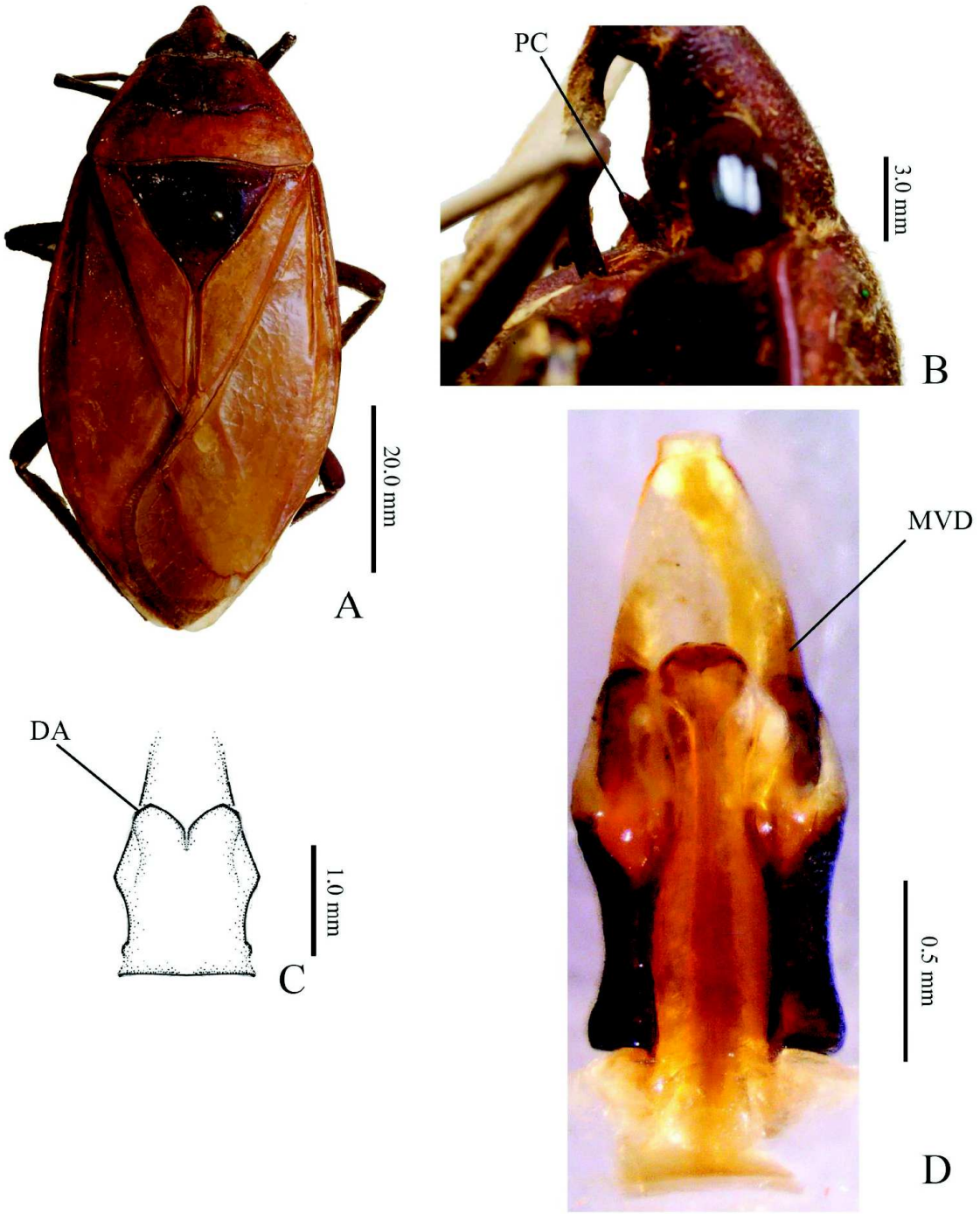


FIGURE 5.Limnogeton scutellatumMayr,externalmorphologyandmalegenitalstructures.5A,Dorsalhabitusshowing pronotum.5B,Head showingprosternalcarina,lateralview.5C–D,Male genitalstructures:5C,Dorsalapicalmembranous processesarisingfromphallotheca.5D,Ventraldiverticulumofphallosomashowinganteriormargins, ventralview.LMC, longitudinalmediancarina;MVD,marginsof ventraldiverticulum;PC, prosternalcarina.

Measurements(m/f):Totallength(fromapexofheadtoapexofabdomenatrest):42.5–50.0/47.0–49.0; greatestwidthof body:20.5–23.1 /22.0–24.0.

General coloration.Almost uniformly brown.Body ovate with wings almost covering abdomen.

Head, thorax, and abdomen. Pronotum with longitudinal median carina usually extending only onto posterior portion; prosternal keel cylindrical and straight, spiniform, acute at apex, not projecting anteriorly (femalesusually

With prosternal keel more robust). Pilosity poorly developed, covering almost half of connexivum,slightly constricted between spiracles, not extending posteriorly along genital operculum (as Fig.3C).

Male genitalia.Parameres symmetrical with apex strongly curved; length of phallotheca about 1.5 times Ventral diverticulum in dorsal view; ventral diverticulum not robust; dorsal arms of phallotheca directed laterally, slightly divergent, connected or fused along basal portion, U-shaped, rounded at apex (Fig. 5C); ventral diverticulum with anterior margins not strongly sclerotized, some what robust, parallel posteriorly in ventral view (Fig. 5D, MVD).

Taxonomic notes. There is no significant difference in male styli among specimens of L. expansum and L. scutellatum,but the former species clearly comprises the majority of the largest specimens studied. Poisson (1949) stated that thealleged "differences" in male styli, also stressed and discussed by Linnavuori (1971), are not enough to differentiate these species. Poisson thus considered them as conspecific, with L. expansum representing merely large specimens of L. scutellatum. Nevertheless, we have found evident male genitalic characteristics distinguishing L.scutellatum from L.expansum, and these are apparently linked to the differences in growth among these insects (see above). For example, L. scutellatum male specimens, the majority of which are smaller than those of L. expansum, have the dorsal arms (Fig. 5C, DA) not gradually narrowing at the apex and shorter than in L. expansum (Fig. 1D, DA).

Taxonomic key to adults of Limnogeton Mayr (partially based on Poisson 1949)

1a. Prosternal keel robust, cylindrical, slightly curved anterador not, with apex truncated, rounded or acute; dorsal arms of ventral Diverticulum of phallothecalong, well developed. 2

1b. Prosternal keels lender ands piniform, never robust and truncated at apex; straight (Figs.2B, 5B); dorsal arms of ventral diverticulum of phallothecashort, poorly developed (Figs. 2C,5C).. 3

2a(1b). Prosternal keel with apex some what truncated, irregular, slightly directed posterad (Fig.1B, PC); pilosity of connexivum large (Fig.1C, PIL); dorsal arms of ventral diverticulum of male genitalia strongly divergent, narrowing at apex (Fig.1D,DA); lateral margins of ventral diverticulum with out sinuosity... .. ..L. expansum Montandon, 1896 (Fig.1A)

2b. Prosternal keel with apex evidently truncated or acute (Figs. 4B–C, PC), not irregular, slightly directed anterad; pilosity of connexivum slender; dorsal arms of ventrald iverticulum of male genitalia slightly divergent, not narrowing gradually at apex (Fig. 3D, DA); lateral margins of ventral diverticulum with evident sinuosity (Figs. 3E–F,LOM). ……... .. .. ……... .. .. .. .L. hedenborgi Stål,1853 (Fig.3A)

3a(1b). Total length of body 2.2–2.3 times its greatest width; dorsal arms of ventral diverticulum not V-shaped, slightly sinuate (Fig. 2C,DA); length of phallotheca almost twice that of ventral diverticulum in dorsal view; ventral diverticulum with anterior margins not strongly sclerotized, narrower, obviously convergent posteriorly inventral view (Fig. 2D, MVD).. .. .. .. L. fieberi Mayr, 1853 (Fig.2A)

3b. Total length of body about from 2.0 to 2.2 times its greatest width; dorsal arms of ventral diverticulum V-shaped, rounded at apex, more defined and visible (Fig. 5C, DA); length of phallotheca about 1.5 times that of ventral diverticulum in dorsal view; ventral diverticulum with anterior margins not strongly sclerotized, some what robust, parallel posteriorly in ventral view (Fig. 5D, MVD). .. .. ……... .. ..L.scutellatumMayr,1863(Fig.5A)

Acknowledgements

Thanks to Dominique Pluot-Sigwalt (MNHN) and Eliane DeConnick (MRAC) for the loan of specimens and access to collections. Our research is supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científicoe Tecnológico (CNPq). We have no conflict of interest to declare.

References

Armúa-de-Reyes,C.A.& Estévez,A.L. (2006) Predation on Biomphalariasp. (Mollusca: Planorbidae) by three species of the genus Belostoma (Heteroptera: Belostomatidae). Brazilian Journal of Biology, 66, 1033–1035.http://dx.doi.org/10.1590/s151969842006000600009

Estévez, A.L. & Ribeiro, J.R.I. (2011) Weberiella DeCarlo, 1966 (Insecta: Heteroptera: Belostomatidae) revisited: redescription with a key to the genera of Belostomatidae and considerations on back-brooding behaviour. Zoologischer Anzeiger, 250,46–54. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcz.2010.11.002

Fabricius, J.C. (1803) Systema Rhyngotorum secundu mordines, genera, species adjectis synonymis, locis, observation ibus, description ibus. Reichard, Brunsvigae, vi + 314 pp. http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.11644

Lauck, D.R.& Menke, A.S. (1961) The higher classification of the Belostomatidae (Hemiptera). Annals of the Entomological Society of America, 54, 644–657.

Linnavuori,R.(1964)HemipteraofEgypt, withremarksonsomespeciesoftheadjacentEremianregion.AnnalesZoologici Fennici,1,306–356.

Linnavuori,R.(1971)HemipteraoftheSudan,withremarks onsomespeciesofadjacentcountries.1.Theaquaticand subaquaticfamilies.AnnalesZoologiciFennici,8,340–366.

Mayr,G.(1853) Zweineuewanzenaus Kordofan.Verhandlungen derZoologisch-BotanischenVereinsin Wien,2,14–18.

Mayr,G.(1863)HemipterogischeStudien. Die Belostomiden.Verhandlungender Zoologisch- Botanischen Gesellschaft, 13, 339–364.

Mayr, G. (1871) Die Belostomiden. VerhandlungenderZoologisch-BotanischenGesellschaft,21, 399–
440. McGavin, G. C.(1993) Bugsofthe world. Facts On File, Inc., NewYork, 192pp.

Montandon, A. (1896) Hémiptères hétéroptères exotiques. Notes et descriptions. Annales de la Société Entomologique de Belgique,40,508–520.

Montandon, A. (1907) Quelques espèces du genre Ranatra des collections du Muséum de Paris. Annales de la Société Entomologique de France, 76, 49–66.

Poisson, R.A. (1947) Hydrocorises du Cameroun. (Mission J. Carayon1 947). Revue Française d'Entomologie,
15, 167– 177. Poisson, R.A. (1949) Hémiptères aquatiques. Exploration du Parc National Albert (Mission G.F.de
Witte (1933– 1935), 58,1– 94.

Poisson, R.A. (1952) XIII- Hydrocorises. Mémoires de L'I.F.A.N., La Reserve Naturelle Intégrale du Mont Nimba, 19, 277– 287.

Poisson, R.A. (1954) Hémiptèresaquatiques. Exploration du Parc National de l'Upemba. MissionG. F. de Witteen collaboration avec W.Adam, A.Janssens, L.van MeeletR.Verheyen (1946-1949), 31, 1–53.

Poisson, R. A. (1967) Contribution à la faune du Congo (Brazzaville). Mission A. Villiers et A. Descarpentries. LXIII. Hémiptères Hétéroptères Hydrocorises. Bulletin de l'I.F.A.N., 24,1321–1333.

Poisson, R.A. (1968a). Hétéroptères aquatiques. Exploration Hydrobiologique du Bassin du Lac
Bangweolo et du Luapula, 14, 1–50.

Poisson, R. A. (1968b) Contributions à la connaissance de la faune entomologique de la Côte-d'Ivoire (J.Decelle,
1961-1964). XXVI- Hétéroptères aquatiques. Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale, Zoologie, 165,399–
403.

Poisson, R. A. (1969) Hétéroptères aquatiques du Bassin de la Luanza. Exploration Hydrobiologique du Bassin du Lac Bangweolo et du Luapula, 14,1–25.

Poisson, R. A. & deSallier-Dupin, F. (1970) Contribution à l'étude biologique du Sénégal septrentional. III. Hétéroptères aquatiques. Bulletin de l'I.F.A.N., 32, 832–841.

Polhemus, J.T., Jansson, A. & Kanyukova, E. (1995) Infra ordem Nepomorpha–water bugs. Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region, 5 (1),13–76.

Ribeiro, J.R.I. (2007) Are view of the species of Belostoma Latreille, 1807 (Insecta, Heteroptera, Belostomatidae) from the four southeastern Brazilian states. Zootaxa, 1477,1–70.

Schuh, R.T. & Slater, J.A. (1995) True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Cornell University Press, New York, 337 pp.

Stål, C. (1854) Nya Hemiptera. Öfversigtaf Kungliga Vetenskapsakademiens Förhandlingar, 11,
231–255. Stål, C. (1865) Hemiptera Africana.Vol.3. Norstedtiana, Stockholm, 200pp.

Volker, J. (1968) Untersuchungenzu Emährung, Fortpflanzungs biologieund Enticklungvon Limnogeton fieberi (Belostomatidae: Hemiptera) alsBeitragzurKenntnis vonnatürlichen Feinden tropischer Süßwasserschnecken. Entomologischemitteilungenausdem Zoologischen Museum Hamburg, 3,1–24