

CARACTERISATION DE SOUCHES SENEGALAISES ET GAMBIIENNE DE *BACILLUS ANTHRACIS*, AGENT DE LA MALADIE CHARBONNEUSE DES RUMINANTS

CARACTERIZATION FOR SENEGALESE AND GAMBIAN STAINS OF *BACILLUS ANTHRACIS* THE AGENT OF ANTHRAX RUMINANT DISEASE

Mbengue M¹, Ndiaye M²

1. Laboratoire National de l'Élevage et des Recherches Vétérinaires, Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Dakar.

2. Laboratoire de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques, UCAD, Dakar

Résumé

Introduction : La maladie charbonneuse ou Anthrax est due à une bactérie de la famille des Bacillaceae, *Bacillus anthracis* qui a fait l'objet d'une attention particulière au Sénégal, par les importantes pertes économiques occasionnées sur le cheptel ruminant. Six génomes complets de *Bacillus anthracis* (AO248, Ames, Ames Ancestor, CDC 684, H9401 et Sterne) ont été rajoutés aux trois génomes Sénégalais (Sen1, Sen2, Sen3) et Gambien (Gmb1).

Matériel et Méthode : Nos travaux sont axés sur la caractérisation des séquences génomiques de *Bacillus anthracis* pour les souches sénégalaises et gambienne par comparaison à d'autres souches de référence pour préciser la nature exacte du pan-génome.

Résultats : Nous avons trouvé que les souches sénégalaises et gambienne étaient porteuses des deux plasmides pXO1 et pXO2. Les séquences oligonucléotidiques de ces souches montrent une identité de séquence dans les deux pays ciblés et le pan-génome a été estimé comme renfermant 2893 cores génomes, 7 gènes uniques et 85 gènes accessoires.

Conclusion : Cette séquence de *Bacillus anthracis* a été comparée et est identique à celle obtenue à partir du génome de la souche Sterne de la souche CDC 684 et de celle de la H9401 trouvée chez un humain atteint d'Anthrax en Corée. Nous avons validé l'hypothèse selon laquelle les souches de *Bacillus anthracis* testées ont un pan-génome de type fermé. Mots clés : *Bacillus anthracis*, Gambie, pan-génome, Sénégal.

Summary

Introduction: Anthrax is a disease caused by a bacterium of the Bacillaceae family, *Bacillus anthracis* and has been a subject of particular attention in Senegal in the Niayes's area through important economic losses on ruminant livestock. Six complete genomes of *B. anthracis* (AO248, Ames, Ames Ancestor, CDC684, H0491, and Sterne) are currently available. In this report, we add three African strain genomes: Sen2Col2, Sen3 and Gmb1.

Material and method: We report the characterization of the genomic sequences of *Bacillus anthracis* strains for Senegalese and Gambian samples compared to other reference strains to make a response about the identity of these three strains and the pan-genome. Results: We found that the Senegalese and Gambian strains were carrying the two plasmids pXO1 and pXO2. The study of oligo nucleotide sequences obtained after molecular and bioinformatics analysis of these genomes showed the same size, the same value of the G + C %, like CDC 684. The pan-genome has 2893 core genes (99% of the genome size) and 85 accessory genes.

Conclusion: This sequence of *Bacillus anthracis* has been compared and is identical to that obtained from the genome of the Sterne strain, the CDC strain 684 and that of the H9401 found in a human suffering from Anthrax in Korea. We validated the hypothesis that *B. anthracis* has a closed pan-genome. Keys Words : *Bacillus anthracis*, Gambia, pan-genome, Senegal.

Correspondance: Mbaye Mbengue

LNERV – ISRA

BP 2057 – Dakar Hann- Sénégal.

E-mail: mbenguem@yahoo.fr

INTRODUCTION

L'Anthrax, est la première maladie due à une bactérie sporogène décrite par Davaine en 1863 [1]. Elle est la première infection dont un vaccin a été proposé par Pasteur en 1881 [2]. Cette maladie qui atteint les ruminants et d'autres mammifères dont l'homme, est causé par *Bacillus anthracis*, bacille à gram positif non mobile et sporogène. En 1876, l'Allemand Robert Koch, découvre la première bactérie *B. anthracis* ayant la capacité de sporuler [3]. Sur le plan de la systématique bactérienne, *B. anthracis* appartient à la division des firmicutes et fait partie du groupe Cereus [4]. C'est un bacille capable de sporuler en milieu tellurique : une bactérie anaérobie facultative pouvant survivre dans des conditions environnementales difficiles, même à des températures élevées. La virulence de la plupart des souches de *Bacillus anthracis* est due à la présence de deux mégalo-plasmides : le plasmide pX02 (60 KDa) qui porte les gènes nécessaires pour la synthèse de la capsule antiphagocytaire, le plasmide de poids moléculaire 110 KDa pX01 [5] qui est requis pour la synthèse de trois protéines toxigènes : le facteur oedématogène, le facteur léthal et l'antigène protecteur. Ces protéines agissent par combinaison pour la production de toxines : à cet effet, et pour ce travail, des éléments restent inconnus à savoir la structure génomique de ces souches sénégalaises et gambienne de *Bacillus anthracis* qui vont faire l'objet d'identification d'abord par les méthodes bactériologiques

classiques moléculaires dans lesquelles le micro séquençage pourra nous orienter éventuellement sur la nature et le degré de variabilité de ces souches et nous permettra de mieux préciser leurs positions par rapport aux souches de références connues de *Bacillus anthracis* dans diverses régions du monde [6]. La première étude sur le pan-génome a été menée en 2005 à partir de *Streptococcus agalactiae* [7], un pan-génome étant défini par un pool de gènes présent dans le génome et permettant de comparer les différentes souches d'espèces microbiennes. L'objectif de ce travail était l'identification des séquences génomiques et la précision sur le pan-génome de *Bacillus anthracis* pour les souches sénégalaises et gambienne par comparaison avec d'autres souches de référence nous permettant d'apporter une réponse qui pourrait être importante concernant l'identité de ces souches. Il est envisagé une fois connue la variabilité génomique de *Bacillus anthracis*, la mise au point d'un vaccin recombinant stable non sujet à des variants non spécifiques contre la maladie du charbon des ruminants dont une partie a déjà été menée [8,9] afin de lutter efficacement contre cette zoonose d'intérêt.

MATERIEL ET METHODE

Sites expérimentaux

Les trois zones qui ont servi aux prélèvements du matériel biologique sont la zone des Niayes (Niague), du parc forestier et zoologique de Hann à Dakar et la zone Gambienne. Les périodes

d'études et les différents prélèvements ont eu lieu en février, avril, juillet 2010 pour les souches sénégalaises et septembre 2011 à la fin de la saison hivernale pour la souche gambienne.

Matériel biologique : Les différentes souches bactériennes à tester sont les suivantes :

- **Sénégal** : 3 souches : Souche n°1 : *Bacillus anthracis* isolée sur une vache de race « Holstein » de la ferme de Wayembam (Niayes du Sénégal) le 09 Février 2010 à partir d'organes (Ganglion, rate, poumon, foie) (**SEN1 = n° 124 21 899**) ; Souche n°2 : *Bacillus anthracis* isolée à partir de poumons d'une autruche male âgée, du parc zoologique de Hann morte en juillet 2010 (**SEN 2 = n° 124 21 900**) ; Souche n°3 : *Bacillus anthracis*, isolée sur un mouton male « Touabire » de la ferme laitière de Wayembam (Niayes du Sénégal) en avril 2010 à partir de prélèvements d'organes (foie, poumon, rate et sang total) (**SEN 3 = n° 124 21 901**).

- **Gambie** : 1 souche : Souche n°1 : *Bacillus anthracis*, isolée sur un bovin « Ndama » en provenance de la localité d'Abuko (laboratoire Central Vétérinaire) en Gambie le 28 septembre 2011 à partir de sang entier (couleur noire) récolté sur EDTA. (**Gamb 1 = n° 124 21 902**).

- D'autres souches (6 souches référenciées) ont été utilisées dans l'étude génomique à titre comparatif, ce sont les suivantes avec leurs caractéristiques particulières : Ames [10], Ames Ancêtre [11], A0248, CDC 684 [12], H9401 [13] et Sterne.

Les animaux : Un bovin de race « Holstein » dont la production moyenne observée est de 20 litres par jour dans la zone des Niayes, une autruche âgée du parc zoologique de Hann Dakar (6 ans d'âge) trouvée morte à la suite de maladie, un mouton de race « Touabire », disposant d'une fertilité et d'une fécondité très améliorée par rapport aux autres races telles que la race « Djallonké » et un bovin de race « Ndama » trypanotolérante.

Méthodologie

Nous avons procédé à une analyse bactériologique et moléculaire suivie d'une interprétation des séquences génomiques obtenues par la méthode bioinformatique.

Le protocole suivant a été mis en œuvre pour notre présente étude :

Etudes moléculaires

Elles ont été réalisées suivant le protocole PO5/BIO/CFX-96 : protocole d'utilisation du CFX 96 Biorad: Extraction de l'ADN, Amplification, PCR, Amplification proprement dite.

Microséquençage

Cette méthode de microséquençage peut être réalisée par la méthode du système SOLID 4 Life technologies. Les stratégies de séquence de 4 souches de *Bacillus anthracis* Sen 1, Sen2, Sen3 et Gmb1 ont été réalisées par le système SOLID 4_Life technologies in NGS (nouvelle génération de séquençage).

Analyse génomique

Réalisée à partir de méthodes informatiques et surtout une étude pangénomique a été effectuée sur l'ensemble des souches de *Bacillus anthracis*.

Pour la caractérisation des souches, la souche de référence utilisée fut Ames.

Le logiciel CLC Genomic a été utilisé. Trois outils informatiques ont été utilisés :

- Logiciel COG (Cluster of Orthologues Groups) nécessaire pour l'analyse fonctionnelle des génomes ;
- Logiciel KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) utile pour mieux comprendre l'analyse métabolique des génomes ;
- Logiciel PCA (Analyse de la composante principale ou Principle Component Analysis) utilisé pour l'analyse statistique des génomes.

Deux méthodes informatiques ont aussi été utilisées : la Méthode d'alignement - MAUVE (Multiple Genome Molecular Evolutionary Genetics Analysis) qui est une méthode d'alignement et MEGA5 (Analyse moléculaire génétique évolutive ou Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Pour la mise en place de l'arbre phylogénétique, nous nous sommes basés sur le MLST (typage génomique multilocus) qui nous a permis d'évaluer la nature fermée ou ouverte du pan-génome. Ensuite, nous avons utilisé le logiciel OrthoMCL [14] pour obtenir une liste des orthologues afin d'en déterminer la composition du pan-génome, nous avons effectué une analyse en composante principale (ACP) en utilisant R,

pour avoir une meilleure vue de la répartition des différentes classes.

RESULTATS

Les souches bactériennes

Les différentes coordonnées relatives aux prélèvements des souches sont consignées dans le tableau I (caractéristiques des souches prélevées).

Etudes moléculaires

Les colonies ont été traitées par la méthode PCR et ont donné les résultats suivants : **Pour les Souches N 899 – SEN1, Souche N°900 Sen 2, Souche N°901 Sen** un signal a été observé pour toutes les souches amplifiées. Les témoins négatifs n'ont pas donné de signal : pour les trois souches sénégalaises, le signal le plus fort est obtenu avec la Sen3 n° 900, suivie de la souche Sen2 901 et de la souche Sen1 899. La **Souche N°902 GMB 1** a aussi donné un signal important.

Microséquençage des souches et analyse génomique

Caractéristiques moléculaires des souches : Les résultats sont rapportés dans le tableau II. Les trois souches africaines (Sen2Col2, Sen3 et Gmb1) ont la même taille et la même valeur du G + C % que toutes les autres souches (5.23 Mb et 35,4%) et le même nombre moyen de protéines (environ 5300) de même que les deux plasmides PxO1 et PxO2 pour toutes les souches testées à

Tableau I: Caractéristiques des souches de *Bacillus anthracis* (prélèvements)

Code	Souches	Pays	Hôte	Origine des échantillons
G192	Sen2Col2	Senegal	Autruche de 6 années d'âge	Poumons
G193	Sen3	Senegal	Mouton de race Touabire	poumon, foie, rate et sang
G194	Gmb1	Gambia	Bovin de race Ndama Trypanotolérante	Sang
Ref souches	Ames	USA	Vâche morte	/
Ref souches	Ames Ancestor	USA	Beefmaster femelle de 14 années d'âge Génisse	/
/	A0248	USA	Humain	/
/	H9401	Korea	Humain	/
/	CDC684	USA	Humain	/
/	Sterne	UK	/	/

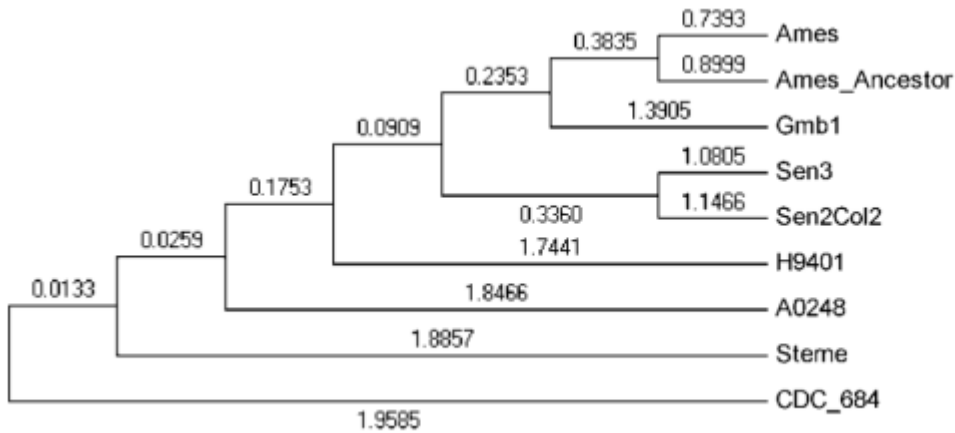


Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur les génomes complets

Tableau II: Pan-génomme de souches pathogènes humaines avec la colonne pourcentage (%) qui correspond au ratio core/pan génome

Espèces	Génomme utilisé	Style de vie	Intracellulaire	Niche	Taille pan génome	Taille core génome	%
<i>B .anthracis</i>	9	allopatric	Non	Animal	47041887	46513801	99
<i>Rickettsia rickettsi</i>	8	allopatric	Non	Tiques	10129221	100112432	99
<i>Chlamydia trachomatis</i>	20	allopatric	Non	Humain	20960000	20689197	99
<i>Rickettsia prowazeki</i>	8	allopatric	Non	Humain	8888959	8869530	100

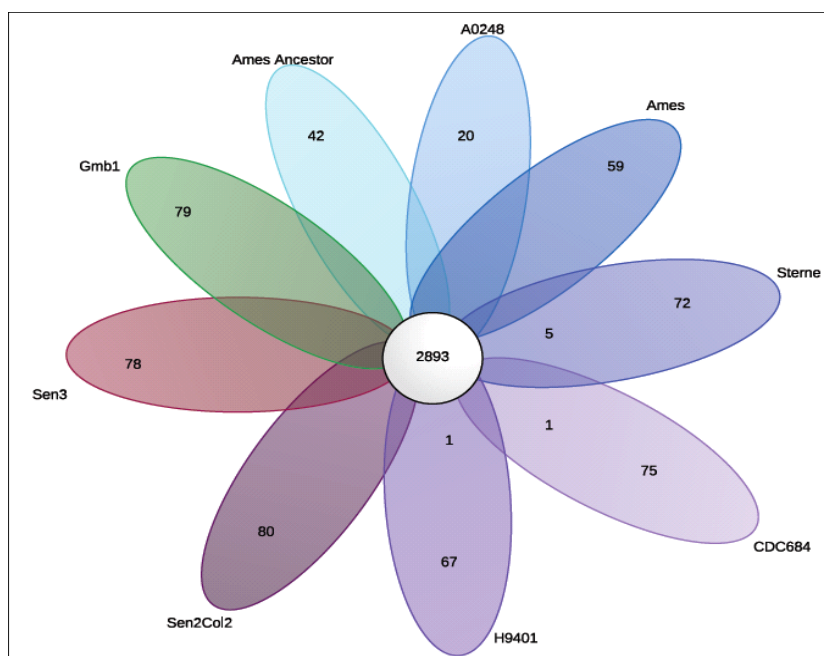


Figure 2: Pan-génomme de *Bacillus anthracis*: pot de fleurs montrant : le pan-génomme de *Bacillus anthracis*. Le nombre dans le cercle est le génome de base. Les chiffres dans la partie supérieure des pétales constituent le nombre de gènes accessoires présents dans chaque souche (sur les 85 au total). Les chiffres à la partie inférieure des pétales est le nombre de gènes uniques dans chaque souche.

l'exception de la souche Sen1 qui n'a pas été bien lue. L'alignement MAUVE n'a révélé aucun réarrangement et l'on note une conservation élevée entre tous les génomes.

Phylogénie

Les résultats sont donnés dans l'arbre phylogénétique (figure 1). Les faibles valeurs des branches ont montré des similitudes importantes entre les différentes souches sénégalaises, gambiennes et les six autres. Ainsi, sur la base MLST, les souches Ames, Ames Ancêtre et A0248 sont regroupées, les trois souches sénégalaises et gambiennes également.

Comparaison génomique KEGG et COG : Analyse des résultats obtenus avec KEGG). Les différences trouvées entre les souches concernent la transduction, le processus et la motilité cellulaire qui sont plus importants pour les trois souches testées à savoir Sen2, Sen3 et Gmb1 en comparaison aux autres.

Comparaison génomique COG et PCA

Les trois souches Sen2, Sen3 et Gmb1, sont dans l'ensemble identiques à CDC684. Lorsque nous avons examiné ces informations, nous avons remarqué deux groupes: l'un avec A0248, Ames et Ames Ancêtre et le second avec les autres souches. Il n'y avait pas de différence significative entre pXO1 et pXO2 des souches sénégalaises et gambienne et celles de la souche A0248, Ames Ancêtre et CDC684.

Etude du pan-génome

Les résultats sont rapportés dans la figure 2. Il s'agit d'un pan-génome qui est composé de 2893 gènes essentiels, 7 gènes uniques et 85 gènes accessoires. Il apparaît comme un pot de fleurs montrant le pan-génome de *Bacillus anthracis* : le nombre dans le cercle est le génome de base. Les chiffres dans la partie supérieure des pétales constituent le nombre de gènes accessoires présents dans chaque souche (sur les 85 au total). Les chiffres à la partie inférieure des pétales est le nombre de gènes uniques dans chaque souche. Les trois souches Sen2, Sen3, Gmb1 et CDC 684 accaparent presque tous les gènes accessoires, tandis que la souche A0248 n'en referme seulement que 20 de ces gènes sur les 85. Les résultats de la comparaison avec le pan-génome de souches pathogènes humaines avec la colonne pourcentage (%) sont rapportés dans le tableau II. De plus, nous avons fait le rapport noyau / pan-génome et nous avons trouvé que le génome de base représentait 99% du pan-génome. Ce dernier montre encore une fois, le taux élevé de conservation entre les 9 souches analysées. La proportion très élevée de la fonction du génome de base comme le pan-génome confirme que la souche de *B. anthracis* constitue une protéine ancienne probablement de 150 ans et qui a cessé d'évoluer.

DISCUSSION

- **Bactériologie**

La bactérioscopie directe réalisée à partir de culot de broyat d'organe a donné des résultats positifs confirmés par des cultures bactériologiques. Les études menées à partir des caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques ont donné des résultats conformes à ceux trouvés par Leminor et al.,[14] sur les critères d'identification de *Bacillus anthracis*. Les quatre souches de *Bacillus anthracis* évaluées pour cette étude bactériologique, peuvent être considérées comme virulentes car ayant montré la présence des deux plasmides PXO1 et PXO2.

- **Etudes moléculaires**

L'amplification par la PCR et la détection des produits pour toutes les souches bactériennes a été réalisée avec le kit Light Cycler Roche, une méthode PCR d'amplification des acides nucléiques qui reconnue comme un précieux outil de diagnostic nécessitant un temps réduit assurant la confirmation du produit après son amplification. Un autre avantage pour cette PCR avec le kit light cycler est la sensibilité, le raccourcissement des délais d'analyse pour la détection directe d'agents infectieux comme *Bacillus anthracis* en clinique animale et humaine.

- **Microséquençage et analyse génomique**

Les caractéristiques générales des trois nouvelles souches sénégalaises et gambienne ont montré qu'elles ont toutes la même taille, la même valeur du C+C% et le même nombre moyen de protéines que les autres souches référencées. En plus, ces

souches renferment chacune les deux plasmides PXO1 et PXO2. Dans ce travail, nous avons donné une validation importante telle que montrée précédemment, à savoir la structure du pan-génome de *B. anthracis* qui est de type étroit. Pour confirmer notre étude, nous avons utilisé différents outils afin de comparer et valider nos résultats. Le ratio core/pan-génome de 99%, est très proche des autres souches pathogènes pour l'homme (tableau III) comme *Rickettsia rickettsii*. Cependant, il y a une discordance entre la présence d'un mobilome (beaucoup de phages et, au moins, un CRISPRs confirmés), et la forte présence de protéines impliquées dans la transcription et la traduction, caractères propres pour un pan-génome fermé. Néanmoins, *Bacillus anthracis* est dérivée du groupe *Bacillus cereus*, une espèce sympatrique qui n'est pas intracellulaire. Donc, *Bacillus anthracis* peut devenir allopatrique. Ceci peut être expliqué par le fait que *B. anthracis* est une bactérie ancienne (au moins 150 ans) qui a cessé d'évoluer. Nous avons testé cette hypothèse en étudiant le SNP basé sur le contenu génomique de base. Le manque de SNPs peut valider notre hypothèse sur l'arrêt de l'évolution de cette espèce, *B. anthracis* qui est une souche ancienne qui s'est stabilisé avec le temps et qui présente un pan-génome de type étroit.

Phylogénie

L'arbre phylogénétique construit à partir de nos résultats sur la base des MLST est cohérent à

celui obtenu par Keim et al., 2000 [5], où deux sous-groupes distincts ont été notés. Ces groupes trouvés montrent une forte homologie de séquence entre les souches sénégalaises, gambienne et la CDC 684 et une différence significative de ces séquences avec certaines souches d'Amérique du Nord dont la A0248, Ames ancestor et Ames : ce qui vient corroborer les observations faites par Keim et al., [5], à partir de résultats obtenus concernant l'étude de la biodiversité de souches de *Bacillus anthracis* dans certaines régions du monde.

Pan-génome

Dans ce travail, nous avons donné une validation importante telle que montrée précédemment [6], à savoir la structure du pan-génome de *B. anthracis* à partir des souches étudiées et qui est de type étroit. Pour confirmer notre étude, nous avons utilisé différents outils afin de comparer et valider nos résultats.

Tout va dans le même sens après, l'addition des trois souches sénégalaises et gambienne qui n'influe pratiquement pas sur la nature fermée de ce pan-génome (2893 gènes essentiels, 7 gènes uniques et 85 gènes accessoires), avec un ratio core / pan-génome de 99%. Ce ratio core / pan-génome est très proche des autres souches pathogènes pour l'homme comme *Rickettsia rickettsii*.

CONCLUSION

Cette étude génomique comparative a permis de montrer une très forte similarité au sein des

souches de *B. anthracis* Sen2, Sen3 et Gmb1 ce qui pourrait contribuer à la mise au point d'une souche vaccinale recombinante commune dans les deux pays ciblés. Nous sommes dans le cas d'un pan-génome très fermé avec une espèce qui ne vit pas dans l'environnement.

Ce travail a été financé par la fondation Méditerranéenne de recherches sur les maladies infectieuses tropicales et émergentes (URMITE)

REFERENCES

1. **Davaine C.** Recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de *sang de rate*. Compt Rend Acad Sciences. 1863;57:220-223.
2. **Pasteur L, Chamberland C, Roux M.** Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près de Melun, sur la vaccination charbonneuse. C R Acad Sci. 1881;192:1378-1383.
3. **Koch R.** Ntersuchungen über Bakterien Die Etiologie der Milzbran-Krankheit gegründet auf die Entwick lungs geschichte des *Bacillus anthracis*. Beitr Biol Pflanz. 1876;(2)277-:310.
4. **Wang DB, Tian B, Zhang ZP et al.** Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detection system. Biosens Bioelectron. 2013;42:661-667.

- 5. Uchida I, T Sekizaki, K Hashimoto, and N. Terakado.** Virulence and immunogenicity in experimental animals of *Bacillus anthracis* strains harbouring or lacking 110MDA and 60 MDA plasmids J Gen Microbiol. 1986;**132**:557-559.
- 5. Keim P, Price LB, Amkleyvytska Smith KL and col.** Multiple – Locus Variable – Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic relationship within *Bacillus anthracis* J Bacteriol. 2000;**182**(10):2928-2936.
- 6. Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ et al.** Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;**102**:13950-13955.
- 7. Mbengue M.** Isolement et caractérisation d’un antigène immunogène de *Clostridium chauvoei*, candidat à la construction d’une souche vaccinale recombinante bivalente contre les deux maladies charbonneuses bovines. Thèse 3ème cycle, 2001 n°57, UCAD, Dakar.
- 8. Mbengue M.** Isolement et identification au Sénégal d’un antigène soluble immunogène de *Clostridium chauvoei*, agent du charbon symptomatique des bovins. Bull Soc Pathol Exot. 2008;**101**(1):3-4.
- 9. Read TD, Peterson SN, Tourasse N et al.** The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. Nature. 2003;**423**(6935):81-86.
- 10. Ravel J, L Jiang, S T Stanley, M R Wilson et al.** The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames “Ancestor”. J Bacteriol. 2009;**191**:445-446.
- 11. Richard T Okinaka, Erin P Price, Spenser R Wolk et al.** An attenuated strain of *Bacillus anthracis* (CDC 684) has a large chromosomal inversion and altered growth kinetics. Nature. 2008;**2**:4.
- 12. Read TD, Peterson SN, Tourasse N et al.** The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. Nature. 2003;**423**(6935):81-86.
- 13. Chen F, Mackey AJ, Stoeckert CJ Jr., Roos DS.** OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. Nucleic Acids Res. 2006; **34**:D363-D368.
- 14. Leminor L, Seeliger H, Ackermann HW, Schneider P.** Study of 2 strains of *Citrobacter* O 127:B8. Ann Inst Pasteur (Paris). 1964 ;**106**:112-114.