

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

**ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE
L'ENVIRONNEMENT**

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2015

N° d'ordre : 166



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Génétique des populations

Présentée par

Mbaye MBENGUE

**MICROBIOLOGIE ET STRUCTURATION GENETIQUE DE SOUCHES
SENEGALAISE ET GAMBIENNE DE *BACILLUS ANTHRACIS***

Soutenue le 27 Novembre 2015 à la Faculté des Sciences et Techniques devant le jury
composé de :

Président : Ousmane FAYE, Professeur, FST/UCAD

Rapporteurs : Aïssatou Gaye DIALLO, Professeur, FMPOS/UCAD
Amy Gassama SOW, Professeur, ESP/UCAD
Evelyne FORANO, Directrice de Recherches INRA- Clermont
Ferrand

Examineurs : Moussa Fafa CISSE, Professeur, FMPOS/UCAD
Mbacke SEMBENE, Professeur, FST/UCAD
Iyane SOW, Professeur, FMPOS, UCAD

Directeur de thèse : Mady NDIAYE, Professeur, FST/UCAD

REMERCIEMENTS

AU NOM D'ALLAH

LE TOUT PUISSANT

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui de
près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail

IN MEMORIAM

Mon père Elhadji Mamadou MBENGUE

Ma mère Fatou DIONE

Mon beau père Elhadji Alioune DIOP

Ma belle mère Aida FALL

Dr Saydil Moukhtar Kountha TOURE,

Ma tante Aissata BA

Ma sœur Aissatou MBENGUE

Ma belle sœur Ramatoulaye TOURE

Mon Beau frère Elhadji Abdou Karim DIOP

Tous mes proches rappelés à Dieu

Vous nous avez quittés mais vous êtes toujours présents dans nos cœurs et nos esprits. Qu'ALLAH le TOUT PUISSANT vous accueille dans son paradis éternel. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance pour tous les sacrifices consentis pour le bonheur et la réussite de toute la famille. Nous aurions voulu qu'aujourd'hui, vous soyez parmi nous mais Dieu en a décidé autrement ; nous ne pouvons que nous soumettre à sa volonté et il est le seul qui puisse nous récompenser. Merci infiniment et à vous tous. Que la terre de l'Eternel vous soit légère.

Ce jour est le vôtre et reposez en paix.

Je dédie ce travail à

Serigne Cheikh Ahmed Tidiane SY Al Makhtoum

Serigne Cheikh Mouhamadou Moustapha SY, Responsable Moral des Mourtarchidines Wal Moustarchidaty

Mes Parents

Que ce travail soit pour vous un modeste témoignage de mon attachement sincère, de ma profonde gratitude : vos prières ne m'ont jamais fait défaut et nous ont toujours orientés vers le droit chemin de l'ISLAM

Sincères affections filiales

Mon Epouse

Ton amour, ta patience, ton soutien à tous les niveaux m'ont donné la force et la persévérance nécessaire pour mener à bien mes recherches.

Qu'ALLAH le TOUT PUISSANT te garde toujours à mes côtés.

Trouve dans ce travail, l'expression de ma vive reconnaissance et de ma très profonde et sincère gratitude

Mes Enfants

Pour vous encourager dans vos études et vous inciter à mieux faire

Mes frères et sœurs

Ce travail est le vôtre, sincères affections

Mes beaux parents

Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude

Je remercie profondément toutes les personnes qui ont contribué à cette soutenance en l'occurrence :

Monsieur Pape Abdoulaye SECK, Ministre de l'Agriculture et de l'Equipeement Rural (MAER), pour sa contribution inestimable apportée à ma carrière scientifique au sein de l'ISRA, toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Monsieur Alioune FALL, le Directeur Général de l'ISRA

Pour m'avoir autorisé à préparer cette thèse en Microbiologie animale à l'UCAD, toute ma reconnaissance et mon respect.

Monsieur Elhadji TRAORE, le Directeur Scientifique de l'ISRA, pour son soutien sans faille

Monsieur Momar Talla SECK, Directeur du LNERV, toute notre reconnaissance et notre sincère gratitude pour votre appui toujours indéfectible.

Monsieur Mady NDIAYE, Responsable du Laboratoire d'Entomologie de Bactériologie et de Rickettsiologie et de Virologie (LEBRV) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD, pour avoir accepté de m'encadrer et de diriger mes travaux de thèse : votre présence ici est pour moi un très grand honneur de par votre diligence et votre encadrement sans faille : Très Sincères reconnaissances

Monsieur Moussa Fafa CISSE, Chef du Service de Microbiologie de la Faculté de Médecine et d'Odonto Stomatologie de l'UCAD, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse malgré son emploi du temps très chargé, toute notre reconnaissance et notre respect.

Monsieur Mbacke SEMBENE, Responsable de la formation en Génétique des populations de l'Ecole Doctorale Sciences de la vie et de l'Environnement (ED-SEV) de l'UCAD, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse malgré ses nombreuses occupations, toute notre profonde reconnaissance et notre respect.

Monsieur Iyane SOW, Directeur des Laboratoires du Ministère de la Santé et de l'Action Sociale, pour avoir bien voulu accepter de faire partie de ce jury de thèse malgré ses nombreuses occupations : Toute notre profonde gratitude et notre profond respect.

Madame Aissatou Gaye DIALLO, Directrice Adjointe du Centre Collaborateur ONUSIDA, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse malgré ses multiples occupations : toute notre profonde gratitude

Monsieur Ousmane FAYE, Expert en Paludologie au département de Biologie animale de la faculté des Sciences et techniques de l'UCAD, d'avoir bien voulu accepter de présider mon jury de thèse, toute notre profonde reconnaissance et notre grand respect.

Madame Amy GASSAMA SOW, Chef de service de Microbiologie de l'Institut Pasteur de Dakar, d'avoir bien voulu accepter de faire partie de ce jury de thèse : toute notre profonde gratitude

Madame Evelyne FORANO, Directrice Adjointe de l'INRA de Théix Clermont Ferrand, d'avoir bien voulu accepter de faire partie de ce jury de thèse : toute notre profonde gratitude

Monsieur Didier RAOULT, Directeur de L'URMITE de l'Université Aix Marseille II - Provence pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir facilité la mise en exécution de mes activités de recherches, toute notre reconnaissance d'avoir bien voulu faire partie de ce jury de thèse : toute notre profonde gratitude.

Monsieur Pierre Edouard FOURNIER de l'URMITE, Responsable Chargé des maladies charbonneuses de m'avoir assuré un bon suivi par le biais de son équipe dirigée par Mr Bernard LASCOLA et Mme Catherine ROBERT que je remercie vivement sans oublier personne à l'URMITE dont Mme Valery FILOSA, Francine VERIN

Monsieur Gimonneau GEOFFREY, Chercheur du CIRAD, de par sa grande disponibilité et son ouverture sans faille, toute notre profonde gratitude et notre grande reconnaissance.

Monsieur Malick FAYE, Chef du service d'odontologie à l'Hôpital d'enfants Albert ROYER de Fann, pour sa grande disponibilité et son appui sans faille, toute notre profonde gratitude et notre grande reconnaissance.

Monsieur Cheikh Tidiane BA, pour vos sages et utiles conseils et votre grande disponibilité : toute notre gratitude et notre profonde reconnaissance.

Monsieur Bhen Sikina TOGUEBAYE, pour votre ouverture et votre disponibilité qui ne m'ont jamais fait défaut : toute notre profonde reconnaissance

Monsieur Oleg MEDIANNIKOV pour sa collaboration dans la mise en œuvre de cet important travail

Tout le personnel du LNERV

Madame Bineta TOURE, Belle sœur et à toute sa famille pour sa grande sympathie, sa franchise, ses excellentes qualités morales et sincères, nous lui adressons toute notre reconnaissance et notre gratitude.

Monsieur Bassamba MBENGUE, pour ses bons et généreux conseils et à toute sa famille. Notre profonde gratitude

REMERCIEMENTS	
SIGLES ET ACRONYMES	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
RESUME.....	1
SUMMARY	2

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	3
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES ET CARACTERISTIQUES DE« <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> »	6
I. HISTORIQUE	9
II. CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES DE <i>Bacillus anthracis</i>	10
2.1 Morphologie	10
2.2 Culture	11
2.4 Germination	12
2.5 Cycle biologique	13
2.6 Caractères antigéniques	14
2.7 Diversité génétique des souches de <i>Bacillus anthracis</i>	15
III. LES FACTEURS DE VIRULENCE.....	17
3.1 La capsule.....	17
3.2 Les toxines	20
IV. CARACTERISTIQUES DE L'INFECTION	36
4.1 Epidémiologie	36

4.2 Ecologie	37
4.2.1 Habitat	37
4.2.2. Mode de transmission	38
4.2.3 Répartition géographique	38
4.3 Physiopathologie	39
4.4 Formes cliniques	47
4.4.1 Forme cutanée	48
4.4.2 Forme gastro intestinale	49
4.4.3 Forme pulmonaire	49
4.4.4. Anthrax injectable	51
V. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE	54
5.1 Prélèvements	54
5.2 Diagnostic bactériologique	55
5.3 Diagnostic moléculaire.....	57
5.4.Analyse génomique	61
5.5 Diagnostic sérologique	57
5.6 Pouvoir pathogène expérimental	62
VI. TRAITEMENT ET PREVENTION	63
6.1. Base du traitement de l'anthrax	63
6.2. Prévention de l'anthrax	64
6.2.1. Principe de la prévention	64
6.2.2. Les vaccins	64
VII. MESURES PROPHYLACTIQUES	71
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL	72
Présentation du Travail	73
I. SITES D'ETUDES	75
1.1. Zones et périodes d'études	75

1.2. Cadre de l'étude	77
II. MATERIEL ET METHODES	78
2.1. Echantillonnage	78
2.1.1. Animaux et souches	78
2.1.2. Autres souches référencées : 6 souches	79
2.2. Méthodologie	81
2.2.1. Etudes bactériologiques	82
2.2.2. Etudes moléculaires de <i>Bacillus anthracis</i>	83
2.2.2.1. Extraction en vue d'une PCR	83
2.2.2.2. PCR A TEMPS REEL	83
2.2.2.3. Microséquençage	86
2.2.2.4. Analyse génomique	86
III. RESULTATS	90
3.1. Caractéristiques générales des souches bactériennes	90
3.2. Etudes bactériologiques	90
3.2.1. Culture de <i>Bacillus anthracis</i>	90
3.2.2. Etude du pouvoir pathogène expérimental	93
3.3. Méthode moléculaire	94
3.3.1. Caractérisation moléculaire des souches (méthode PCR)	98
3.3.2. Microséquençage des souches	98
3.3.3. Analyse génomique par l'outil bio informatique	100
IV. DISCUSSIONS	108
V. CONCLUSION GENERALE	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113
WEBOGRAPHIE	139
ANNEXE	

Sigles et Acronymes

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNr :	ADN ribosomal
ARNr :	Acide Ribonucléique ribosomal
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ANTXR1 :	Anthrax toxin receptor 1
ARAP3 :	Arf and Rho Gtpase activating protein 3
ARNm :	Acide RiboNucléique Messenger
AVA :	Anthrax Vaccine Adsorbed
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité des Médicaments
AMC :	Acetyl Methyl Carbinol
CDC :	Center for Diseases Control
CMH :	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
cJNK :	c jun N terminal Kinase
CXCL :	CX – Chemokine Ligand
CCL :	CC – Chemokine Ligand
CREB :	Cyclic AMP Response Element Binding
CELISA :	Competition Enzym Linked Sorbent Assay
CNR :	Centre National de Référence
COG :	Cluster of Orthologues Groups
EDTA :	Ethylène DiAmine Tétra Acétique
ePCR :	Polymerase Chain Reaction Electronique
emPCR :	PCR en émulsion permettant l’amplification clonale
EF :	Facteur oedématogène
FST :	Faculté des Sciences et Techniques

G S K3β:	Glycogen Synthetase Kinase 3 Béta
GBEA :	Bonnes Pratiques d'Exécution des Analyses
IRD :	Institut de Recherches pour le Développement (anciennement ORSTOM : Office Français de Recherche et Scientifique et Technique d'Outremer)
ISRA :	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles.
IL :	Interleukine
IRF – 3 :	Interferon – Regulatory Factor – 3
KAAS :	KEGG Server d'Annotations Automatiques
KEGG :	Encyclopédie de Kyoto des Gènes et Génomes
LPS :	LipoPolySaccharide
LNERV :	Laboratoire National d'Elevage et de Recherches Vétérinaires
LEBRV :	Laboratoire d'Entomologie, de Bactériologie, Rickettsiologie et de Virologie
LT :	Toxine létale
LMPA :	Laboratoire de Microbiologie et de Pathologie Aviaire
LF :	Facteur léthal
LRP6 :	low -density-lipoprotein receptor 6
MAPK :	Mitogen activated protein Kinase
MAUVE :	Méthode d'Alignement Multiple du Génome en présence d'événements évolutifs
MET :	Microscopie électronique à transmission
MIDAS :	Metal ion dependant adhesion site
MKK :	Mitogen activated protein Kinase
MVB :	Multi vesicular bodies
MLST :	Multilocus Locus Sequence Typing
NGS :	Next Generation Software Solution
NCBI :	National Center for Biotechnology Information

NSB3 :	Sécurité Biologique de niveau 3
NJ :	Méthode des distances ou Neighbor Joining
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PA :	Antigène protecteur
PBS :	Phosphate Buffered Solution
Pb :	Paire de base.
PCA :	Analyse de la composante principale/ Principle Component Analysis
PGA :	Phospho Acide gamma – D glutamique
PGE2 :	Pprostaglandine E2
pX01 :	Plasmide responsable de l'activité toxique chez <i>Bacillus anthracis</i>
pX02 :	Plasmide responsable de la virulence chez <i>Bacillus anthracis</i>
PNN :	PolyNucléaires Neutrophiles
PLA2 :	Phospholipase A2
PKA :	Proteine Kinase Activator
PKR :	RNA – dependent protein Kinase (Protein Kinase RNA)
PPE :	Pouvoir Pathogène Expérimental
ROS:	Reactive oxygen species
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
TLR 4:	Toll – Like receptor 4
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TE :	Tampon d'élution
URMITE:	Unité des Recherches sur les Maladies Infectieuses, Transmissibles et Emergentes
UCAD :	Université Cheikh Anta DIOP de Dakar
VCAM :	Vascular Cell Adhesion Molecule

LISTE DES FIGURES

Numéros :	Titres	Pages
1 :	Représentation de l'expérience de Pouilly le Fort en mai 1881	7
2 :	Structure de la spore de <i>B. anthracis</i>	10
3 :	Germination des spores de <i>Bacillus anthracis</i>	12
4 :	Arbre phylogénétique d'espèces de <i>Bacillus anthracis</i>	16
5 :	Représentation schématique de la synthèse du PGA chez <i>B. anthracis</i> (A) et chez <i>B. subtilis</i> (B).	18
6 :	Structure secondaire du facteur oedématogène de <i>B.anthraxis</i> seul (A) ou du complexe EF CAM – ATP (B)	21
7 :	Structure du facteur létal de <i>Bacillus anthracis</i>	22
8 :	Mécanismes d'internalisation et mode d'action intracellulaire des toxines	26
9 :	Représentation schématique du système de régulation connu des gènes de virulence chez <i>B. anthracis</i>	33
10 :	Système expérimental d'infection par inhalation chez le lapin	39
11 :	Radiographie thoracique d'un patient atteint d'anthrax	43
12 :	Forme cutanée de la maladie du charbon avec les escarres noires Caractéristiques	48
13 :	Forme gastro-intestinale de la maladie du charbon	49
14 :	Forme pulmonaire de la maladie du charbon	51
15 :	Forme Anthrax injectable-----	54
16 :	Schéma méthode de diagnostic-----	58
17 :	Typage de <i>Bacillus anthracis</i> -----	61
18 :	Carte de République du Sénégal (sites d'études)	75

19 : Morphologie de <i>Bacillus anthracis</i>	92
20 : Résultats de la détection des produits PCR plaque 1 avec les amorces R et S	94
21 : Résultats de la détection des produits PCR plaque 2 avec les amorces R et S	95
22 : Résultats de la détection des produits PCR plaque 3 avec les amorces R et S	96
23 : Résultats de la détection des produits PCR plaque 4 avec les amorces R et S	97
24 : Arbre phylogénétique de souches de <i>B.anthraxis</i> A, B, et C.....	100
25 : Analyse des résultats KEGG / PCA : A et B	101
26: Résultats obtenus avec COG et PCA. : A et B.....	102
27 : Structure du pan – génome	104
28 : Clustering hiérarchique	106

LISTE DES TABLEAUX

Numéros	Titres	Pages
I :	Diagnostic différentiel de <i>Bacillus anthracis</i>	56
II :	Pangenome de souches pathogènes humaines avec colonne des % correspondant au ratio core/p--	59
III :	Fiche descriptive de la souche Ames	81
IV :	Origine des souches-----	90
V :	Caractéristiques générales des souches	91
VI :	Caractéristiques moléculaires des souches	93
VII :	Rapport noyau/Pangénome	98

RESUME

La maladie charbonneuse ou Anthrax ou Charbon bactérien est due à une bactérie de la famille des *Bacillaceae*, *Bacillus anthracis* (dénommée Bactérie charbonneuse par Davaine en 1863) qui a fait l'objet d'une attention particulière au Sénégal, par les importantes pertes économiques occasionnées dans le cheptel ruminant dans certaines zones écologiques plus précisément dans la zone des Niayes.

L'objectif principal de cette thèse est axé sur la caractérisation des séquences génomiques de *Bacillus anthracis* pour des souches sénégalaises et gambiennes par comparaison à d'autres souches de référence et sur l'étude du pangénome de *Bacillus anthracis*, de ces souches, une première du genre après celle trouvée par Tettlin *et al.*, en 2005 à partir du génome de *Streptococcus agalactiae*. Des études microbiologiques classiques ont permis l'isolement et l'identification de ces souches de *Bacillus anthracis*, de même que leur purification et leur conservation à -80°C. Des études moléculaires de ces souches purifiées ont permis de caractériser les séquences génomiques d'espèces originaires du Sénégal et de la Gambie. L'analyse des séquences nucléotidiques par bio informatique de ces génomes a montré une identité de séquence pour la souche *Bacillus anthracis* dans les deux pays ciblés.

Cette séquence de *Bacillus anthracis* a été comparée aux souches de référence et est identique à celle obtenue à partir du génome de la souche Sterne (Institut Pasteur de Paris) de la souche CDC 684 (NCBI – USA) et de celle de la H9401 trouvée chez un humain atteint d'Anthrax en Corée.

Grâce à la méthode MAUVE, les auteurs ont estimé le pangénome de *Bacillus anthracis* comme disposant de 2893 gènes, de 7 gènes uniques et de 85 gènes accessoires et ont pu confirmer sa nature fermée, avec le core génome qui représente 99 p 100 de sa taille totale. Il est envisagé ainsi à partir de ces souches dont les séquences sont connues, la mise au point d'un vaccin recombinant contre la maladie du charbon des ruminants.

MOTS CLES : Anthrax, *Bacillus anthracis*, Génome, pangénome, Gambie, Sénégal, *Streptococcus agalactiae*

SUMMARY

The disease anthrax is caused by bacteria of the family of *Bacillaceae* *Bacillus anthracis* (called Bacteridie by Davaine in 1863), and were a subject for special attention in Senegal by the significant economic losses observed on the stock of cattle in some ecological zones more precisely in the Niayes's area.

Conventional microbiological studies allowed the isolation and identification of *Bacillus anthracis* strains and their purification and storage at -80°C. Studies of these purified strains have allowed characterizing and identifying the genomic sequences of these species originated from Senegal and Gambia. The analysis of oligonucleotide sequences by bio informatic indicates a sequence identity for *Bacillus anthracis* in both countries areas.

These *Bacillus anthracis* sequences were compared and were identical to that found in Korea from human suffering of anthrax.

This study has allowed the possibility to characterize *Bacillus anthracis* pangenome, the one after that found by Tettlin and coll in 2005 from *Streptococcus agalactiae* genome.

The authors have estimated with Mauve method the Senegalese and Gambian *B.anthraxis* pan-genome which includes 2893 core genes, 7 single genes and 85 accessory genes. Theses authors have also notified the closed nature of *B.anthraxis* pan - genome for theses strains, where the core genome represents 99% of the total size and validated the hypothesis that Senegalese and Gambian *B.anthraxis* strains have a closed pan-genome. It will be an opportunity to make a recombinant vaccine against Anthrax to protect animal and human from this zoonotic disease.

KEYWORDS

Anthrax, *Bacillus anthracis*, Genomic, pan -genome, Gambia, Senegal, *Streptococcus agalactiae*,

INTRODUCTION GENERALE

L'anthrax fut la première maladie à être attribuée à un microbe spécifique suite aux travaux de Davaine en 1863. Il s'agit de la première infection animale pour laquelle un vaccin a été mis au point par Pasteur, en 1881. Les premiers rapports présumés sont apparus dans les manuscrits sanskrits et dans le livre biblique de l'Exode (Friedlander *et al.*, 1993). En 1876, Robert Koch a découvert pour la première fois une bactérie qui a la capacité de se transformer en spores : *Bacillus anthracis*. Le charbon a joué un rôle important dans l'avancement de la Microbiologie moderne avec le développement par Robert Koch du premier vaccin utilisant une souche atténuée bactérienne (Koch. R, 1876 ; Chamberland, 1883).

La maladie du charbon est une anthroponose connue depuis l'Égypte pharaonique : elle est probablement responsable d'une des sept grandes plaies qui s'abattirent sur les pays du temps de Moïse (Exode, VII – XII). Durant l'Antiquité, Virgile (70 – 19 av. J – C) fait référence à la maladie dans les Géorgiques (Dirckx, 1981). En 302, Eusèbe (265 – 340) décrit une épidémie qu'il désigne sous le nom d'« anthrax » en observant les viscères noirs sur les cadavres d'animaux (anthrakos en grec signifie charbon). Au moyen âge, la maladie est connue sur tout le continent européen et principalement en Grande – Bretagne où elle reçoit le nom de « black bane ».

Au XIX^{ème} siècle, les recherches tendent à caractériser et à décrire l'agent pathogène responsable de la maladie. La présence de « bâtonnets » ou « filaments » dans le sang ou les organes particulièrement la rate des individus infectés est toujours observée sans pouvoir prouver l'implication de ces éléments dans l'infection charbonneuse. La même longévité peut grandement influencer sur l'écologie et l'évolution de cet agent pathogène dangereux. Cette étape de repos constituée par la spore, peut probablement réduire de manière considérable le taux de changement évolutif, ce qui peut contribuer à la nature extrêmement homogène de *Bacillus anthracis* (Keim, P., A *et al.*, 1993).

Le point sur l'état actuel des connaissances sur *Bacillus anthracis* de même que l'optique de la préparation d'une souche vaccinale recombinante, s'avèrent importants à plus d'un titre et nous permet de mieux mener notre étude sur la génomique et d'envisager des études sur la recombinaison génétique à partir de vecteurs de gènes codant pour des antigènes immunogènes ciblés.

Les études sur la structure génomique de la bactérie charbonneuse *Bacillus anthracis* n'ont pas encore fait l'objet de recherches dans la sous région ouest Africaine particulièrement au Sénégal et en Gambie, bien qu'elles aient été déjà menées dans plusieurs localités à travers le monde dont l'Afrique du Sud, l'Amérique du Sud, l'Amérique du nord, l'Europe, l'Australie et l'Asie. ((Keim, P., A *et al.*, 1993).

L'identification et la caractérisation moléculaire de souches bactériennes sénégalaises et gambienne d'intérêt infectant les ruminants voire l'homme, dans le but d'en préciser la variabilité génétique, de même que la structure du pangénome, constituent plusieurs objets de cette thèse qui comporte deux grandes parties : La première concerne les données bibliographiques faisant le point sur les connaissances en matière de pathologie charbonneuse chez les animaux et chez les humains, de vaccins et de la vaccination contre cette maladie, de l'étude moléculaire de déterminants antigéniques, des notions de recombinaison génétique, l'anthrax injectable, entre autres aspects applicables dans ce domaine. La deuxième partie présente le travail personnel réalisé.

PREMIERE PARTIE

Rappels Bibliographiques

Caractéristiques de « Bacillus anthracis »

I. HISTORIQUE

La maladie charbonneuse est connue depuis l'antiquité (plaies d'Egypte). Les troupeaux de moutons sont ravagés, mais la maladie frappe les bovidés ainsi que les chèvres.

Dès 1780, Chabert décrit la maladie animale et insiste sur la coloration noire des organes des animaux charbonneux.

En 1785, Chaussier observe chez l'homme la survenue de la pustule maligne.

Au XIX^{ème} siècle, les recherches tendent à caractériser et à décrire l'agent pathogène responsable de la maladie. La présence de « bâtonnets » ou « filaments » dans le sang ou les organes particulièrement la rate des individus infectés est toujours observée sans pouvoir prouver l'implication de ces éléments dans l'infection charbonneuse. En 1850, Casimir – Joseph Davaine (1812 – 1882) observe lui aussi ces « petits corps filiformes » ; treize ans plus tard il démontre l'origine bactérienne de la maladie du charbon (Davaine, 1863). C'est Robert Koch (1843 – 1910) qui, en 1873, identifia et caractérisa l'agent étiologique responsable de la maladie. Koch nomme le pathogène *Bacillus anthracis* selon la classification systématique bactérienne alors établie par le microbiologiste Ferdinand Cohn (Koch, 1876).

En 1879, Charles Chamberland (1851 – 1908) observe au cours de ses travaux l'existence d'un état réfractaire chez les animaux guéris d'une première atteinte du charbon ou d'une inoculation antérieure. Chamberland est alors directeur adjoint du Laboratoire de Louis Pasteur et ses recherches l'amènent à obtenir des germes de *Bacillus anthracis* à virulence atténuée induisant une forme bénigne de la maladie menant à cet état réfractaire (c'est le principe de l'immunisation).

C'est en 1881 que Louis Pasteur (1822 – 1895), assisté de trois médecins, Roux, Chamberland et Joubert, réalise l'expérience de Pouilly – le – fort (Figure 1) : la vaccination de moutons par une souche vivante atténuée (Pasteur *et al.*, 1881 ; Chamberland, 1883).

Quinze jours après le deuxième rappel, les moutons vaccinés de *Bacillus anthracis*, deviennent résistants à une infection par une souche virulente, tandis que les moutons non vaccinés

succombent tous rapidement. L'expérience a un éclatant succès et ouvre le début de l'ère de la vaccination : Voir Figure 1 :



Figure 1 : Représentation de l'expérience de Pouilly le Fort en mai 1881 (Pasteur *et al.*, 1881 ; Chamberland, 1883).

En 1890, Elie Metchnikoff (1845 – 1916) décrit les mécanismes de chimiotactisme et de phagocytose de spores de *B. anthracis* par des cellules sanguines qu'il nomme « macrophages », mécanismes qui seront à la base de la théorie de l'immunité cellulaire (Metchnikoff, 1890). Metchnikoff ne se doute alors pas que ces interactions phagocytes - *B. anthracis* seront par la suite au centre des études sur la pathogénèse de la maladie du charbon.

En 1825, Barthelemy réussit à transmettre la maladie à des animaux sains en inoculant du sang des malades.

Vers 1850, suite à l'ampleur des épidémies, une commission est créée dont fait partie Davaine qui découvre dans le sang des animaux atteints des petits bâtonnets mais c'est seulement treize ans après, en 1863, qu'il établit que ces bâtonnets, dénommés bactériidies charbonneuses, sont la cause de la maladie.

En 1876, Robert Koch réussit la culture de la bactérie et observe les spores.

En 1881, la célèbre expérience de Pouilly le Fort donne à Pasteur la possibilité de démontrer la responsabilité de la bactérie dans la maladie et l'efficacité d'un vaccin constitué d'une souche virulente atténuée par vieillissement.

Au milieu du XX^{ème} siècle, deux découvertes importantes vont considérablement accélérer la compréhension de la maladie : l'isolement de la souche vaccinale vétérinaire Sterne et l'identification des toxines, facteurs de virulence de la bactérie. En 1937, Max Sterne (1905 – 1997) isole une souche atténuée acapsulée et stable. C'est à partir de cette souche atténuée Sterne que Smith, en 1961, parvient à isoler et à caractériser les trois facteurs constituant les toxines secrétées par la bactérie : l'antigène protecteur, le facteur oedématogène et le facteur létal (tout d'abord nommés facteurs II, I et III, respectivement) (Stanley et Smith, 1961).

B. anthracis fait partie des agents à fort potentiel d'utilisation comme arme biologique : il est classé comme agent biologique de « classe A » dans la classification du CDC, rang comportant les agents biologiques les plus dangereux. Cette classification est basée sur le pouvoir pathogène, la virulence et le niveau de menace que représente l'agent biologique. *B. anthracis* est une bactérie dont la production est simple et peu coûteuse, sa dissémination est aisée et elle peut résister dans l'environnement sous forme de spores. Le taux de mortalité en cas d'infection par inhalation est élevé et, en cas d'attaque à grande échelle, l'impact psychologique sur la population est sévère

Parallèlement à une utilisation militaire classique, une nouvelle menace est apparue ces dernières années : l'utilisation de l'agent du charbon comme arme bioterroriste. C'est en effet une arme accessible et peu coûteuse pour un groupuscule terroriste et un petit laboratoire, même rudimentaire, suffit pour cultiver la bactérie en peu de temps.

En octobre 2001, les États-Unis ont été la cible d'attaques bioterroristes avec l'envoi d'au moins 5 lettres contaminées par des spores de charbon (Inglesby *et al.*, 2002). Au total, 22 cas de charbon ont été rapportés : 11 cas cutanés et 11 cas pulmonaires dont 5 se sont avérés fatals malgré un traitement antibiotique approprié (Jernigan *et al.*, 2001).

II. CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES

B.anthraxis est un bacille à Gram + appartenant à la famille des *Bacillaceae* au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Bacillales*.

Cette famille regroupe les bactéries sporulantes des genres *Bacillus* et *Clostridium* (Claus et Berkeley, 1980). *B. anthracis* est un membre du groupe *B.cereus* qui comprend également *B. thuringiensis*, *B.cereus sensu stricto*, *B.mycoides* et *B.weihenstephanensis* (Priest et al., 2004).

Le pouvoir pathogène, antigénique et immunisant de *Bacillus anthracis* peut se résumer à partir des points suivants :

2.1. Morphologie

Au cours de son cycle naturel, *B. anthracis* se présente sous deux formes : une spore résistante et infectieuse, et une forme végétative sous forme de bacille, permettant la multiplication de la bactérie (Mock et Fouet, 2001).

B.anthraxis est un bacille de 0,1 à 1,2 µm de diamètre sur 3 à 5 µm de longueur, immobile et capsulé. Les bacilles se présentent sous forme isolée ou en chainettes leur donnant l'aspect de « cannes de bambou » (figure 2)

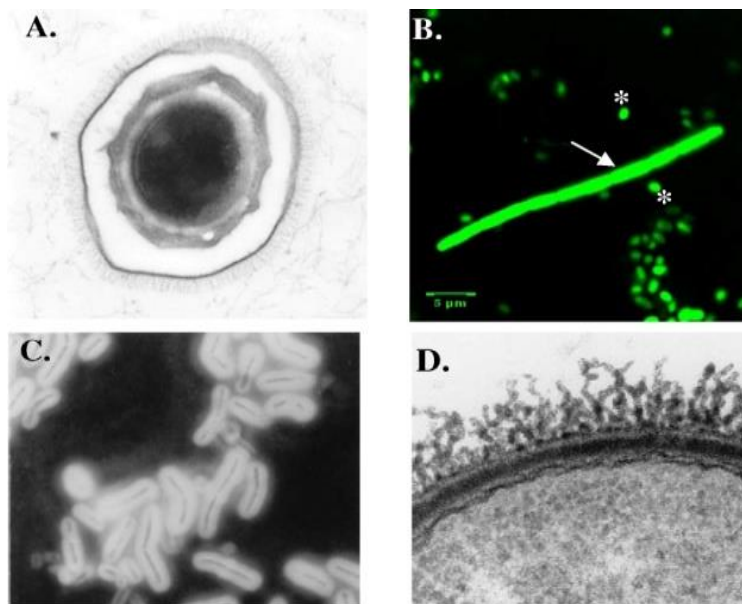


Figure 2 : **A**, Structure de la spore de *B. anthracis* (souche Sterne, acapsulée/toxinogène) observée en microscopie électronique à transmission (MET) (Brochier G., Service d'imagerie, CRSSA) ; **B**, Observation de spores (astérisque) et de bacilles en chaînette (flèche) de *B. anthracis* (souche p6gfp-Sterne) exprimant la gfp (*green fluorescent protein*) en microscopie confocale (Cleret A., Quesnel-Hellmann A., Mathieu J., Tournier J.N., microscope confocal Zeiss LSM510, PLATIM Lyon) ; **C**, Culture de la souche CAF10 (capsulée/atoxinogène) observée en microscopie optique après coloration à l'encre de Chine. La capsule apparaît brillante (d'après Mesnage *et al.*, 1998) ; **D**, Structure de la capsule de la forme végétative de *B. anthracis* (souche CAF10) observée en MET d'après Mesnage *et al.*, 1998).

2.2. Culture

La bactérie a une croissance optimale en conditions classiques aérobie ou anaérobie, à une température comprise entre 30 et 37°C et à un pH compris entre 7 et 7,4. Sur milieu gélosé riche (type gélose au sang), la bactérie forme des colonies larges, plates, rugueuses et à bords dentelés (types « rough » ou R ou dur), tandis que sur milieu enrichi en sérum et en présence de bicarbonate et de CO₂, le bacille synthétise sa capsule et les colonies deviennent petites, lisses et brillantes (type « smooth » ou S ou lisse).

2.3. Sporulation

La bactérie est capable de former des endospores en conditions spécifiques : carence nutritionnelle, aérobie et température comprise entre 18 et 42°C. Le processus de sporulation de bactéries du genre *Bacillus* se décompose en 7 stades nécessitant 6 à 8 heures (Ryter, 1965 ; Stragier et Losick, 1996). La cellule végétative qui donnera naissance à la spore représente le

stade Zéro. Le stade I correspond à la réplication de l'ADN en deux chromosomes et à leur ségrégation polaire. Au cours des stades II et III, une division cellulaire asymétrique conduit à la formation de deux compartiments cellulaires inégaux. Le plus petit est la pré-spore localisée à un pôle de la bactérie, et le plus grand correspond à la cellule mère ou sporange. A partir de ce stade, les deux compartiments possèdent leur propre matériel génétique et leur propre devenir. Les stades IV à VI correspondent à une succession d'apposition d'enveloppes autour de la pré-spore jusqu'à maturation complète de cette dernière. Ils donnent naissance à la spore avec ses propriétés de résistance à la chaleur, aux rayonnements et à une variété d'agents chimiques.

Finalement, au stade VII, des enzymes lytiques détruisent le sporange ce qui permet la libération de la spore présentant une forme vide et mesurant de 0,75 à 1 μm .

2.4. Germination

Les spores peuvent survivre pendant des années dans leur état de dormance, mais si on leur donne le stimulus approprié, dit germinant : les spores peuvent rapidement perdre leurs propriétés de dormance et de résistance de la germination (Fig.3). Le processus de germination est suivi d'excroissance qui convertit les spores germées en une cellule en croissance. Il existe un certain nombre de différents types d'agents qui déclenchent la germination des spores, et certains d'entre eux, tels que des agents tensioactifs cationiques et CaDPA comme la dodécylamine, qui probablement sont importants.

Un de ces agents de germination, haute pression (HP) de l'ordre de plusieurs milliers d'atmosphères, suscite un intérêt croissant dans l'industrie alimentaire, en particulier lorsque HP est combiné avec des températures modérément élevées (Reineke K, *et al.*, 2013).

Cependant, dans la nature, il est probable que la présence de nutriments spécifiques déclenche la germination des spores. Les nutriments germinants peuvent être en liaison de manière stéréospécifique avec des complexes protéiques spécifiques de spores, appelés récepteurs de germination (GRS), dans l'IM. Par exemple, la L-alanine, la L-valine et la L-asparagine peuvent déclencher la germination des spores de *B. subtilis*, tandis que d'autres acides aminés en sont sans action (Christie G, *et al.*, 2010.). En outre, les changements d'acides aminés spécifiques au niveau

des sous-unités de GR, peuvent modifier la spécificité ou la dépendance de la réponse d'un GR à un germinant en éléments nutritifs (Mongkoltharuk W, *et al.*, 2011.).

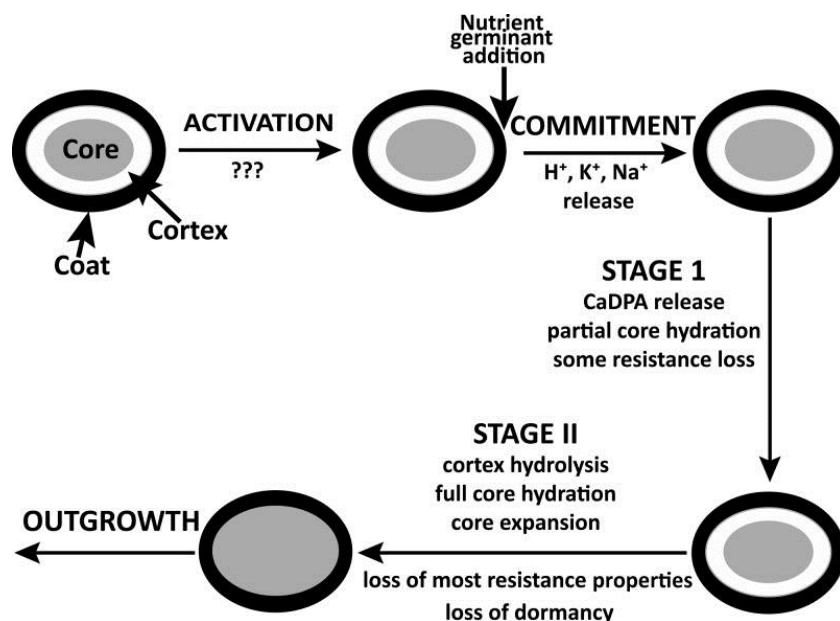


FIG 3 : Aperçu schématique de la germination de spores de *Bacillus anthracis* à partir de nutriment (d'après Setlow, 2014)

Les événements précis dans l'étape d'activation ne sont pas connus et sont donc considérés comme des points d'interrogation. La première étape observée après l'ajout d'un nutriment à un germinant de spores activées est l'engagement et la libération de cations monovalents. Au cours de la phase II, la paroi des cellules germinales (cortex) est hydrolysée.

2.5. Cycle biologique

Le cycle de vie de *B. anthracis* nécessite l'infection d'hôtes mammifères. Schématiquement, les herbivores ingèrent des spores présentes dans le sol. (Lindeque et Turnbull, 1994).

Les spores entrent en phase de germination au sein de l'hôte pour donner naissance à la forme végétative de la bactérie. Les bacilles prolifèrent et produisent les principaux facteurs de virulence que sont la capsule et les toxines, ce qui va conduire à la mort de l'hôte. Après la mort de l'animal, le sang charbonneux noir et incoagulable, caractéristique de la maladie, s'écoule par les orifices naturels. Les bacilles se retrouvent au contact de l'air et entament le processus de sporulation (Lindeque et Turnbull, 1994). Les spores persistent dans le sol jusqu'à un nouveau

cycle d'infection. Chez les animaux, l'infection se fait essentiellement par voie digestive : ingestion de viande crue ou insuffisamment cuite d'animaux morts ou malades (viande d'une origine non contrôlée). Aucun cas documenté n'a été observé après la consommation exclusive de lait, même s'il est possible qu'un risque puisse exister (fourrages pollués, ...).

L'homme peut être infecté par contact avec des animaux ou des peaux contaminés ou par ingestion de viande contaminée. Chez l'homme l'infection se réalise le plus souvent par voie cutanée (maladie professionnelle) : Le plus souvent, par contact de la peau préalablement lésée ou subissant une effraction (blessure, piqure...). L'infection peut aussi se réaliser par inhalation de spores : en cas de bioterrorisme, mais le risque est nul à négligeable lors d'un contact avec un animal charbonneux, en dehors de quelques situations très particulières générant un aérosol.

Durant la période de contagiosité, il n'y'a pas de transmission interhumaine.

Une contamination accidentelle peut se produire par consommation de viande provenant d'animaux abattus pendant l'incubation ou l'évolution du charbon.

On peut signaler des activités exposantes à savoir :

Le travail au contact d'animaux vivants (Eleveurs, Vétérinaires...) ou morts (employés des abattoirs, les bouchers) Les professionnels qui travaillent avec la laine, les soies, les poils ou les cuirs d'animaux possiblement infectés. Les professions en contact avec les sols contaminés (« Champs maudits ») : travaux publics etc... Les personnels de laboratoire vétérinaire : cas particulier du bioterrorisme : personnes en charge du courrier dans les entreprises ou les services postaux, mais peut prendre bien d'autres formes.

Mode de transmission à l'homme et facteurs de risque : Dans le contexte de transmission « naturelle », l'homme est contaminé lors d'exposition aux animaux malades ou aux produits animaux contaminés, par inhalation d'un aérosol de spores pénétrant dans les alvéoles pulmonaires et transportées par la voie lymphatique dans les ganglions médiastinaux.

La germination des spores à ce niveau libère des toxines provoquant hémorragie, œdème et nécrose des tissus ; La transmission peut aussi survenir par ingestion de produits contaminés. La

germination des spores puis la multiplication des bacilles libère les toxines à différents niveaux du tube digestif dont la bouche, l'œsophage ou l'intestin.

2.6. Caractères antigéniques

L'antigène capsulaire : La capsule bactérienne est faite d'une sorte d'exsudat qui reste fixée à la bactérie de manière plus ou moins forte (« Slime layer » = couche de limon, nommée par des anglo-saxons).

L'antigène capsulaire de *Bacillus anthracis* est composé d'un polypeptide qui intervient dans la virulence de la bactérie en empêchant la phagocytose par les macrophages. Il neutralise aussi le pouvoir bactéricide du sérum et rend le sang incoagulable. Il provoque l'élaboration d'anticorps anticapsulaires qui n'ont pas de pouvoir protecteur chez la souris (Handby *et al.*, 1946 ; Leon Le Minor *et al.*, 1989).

La capsule est codée par le plasmide PXO2 (Plasmide de virulence) de *Bacillus anthracis*

Les antigènes somatiques : Ils sont constitués de polysaccharides, mis en évidence par des réactions de précipitation, notamment la réaction d'Ascoli.

La toxine : Elle entraîne la formation d'anticorps neutralisants, jouant le rôle principal dans l'immunité anti charbonneuse ; L'existence d'une toxine charbonneuse était soupçonnée depuis très longtemps ; différentes recherches ont permis d'en préciser la nature et les propriétés (Fish, D, *et. al.*, 1968 ; Pezard C., *et.al.*, 1994)

Des communautés antigéniques entre *Bacillus anthracis* et d'autres espèces de *Bacillus* ont été constatées (Poulet, P, 1972). Ainsi par la technique de l'immunodiffusion en gélose, des chercheurs ont montré l'existence de communautés antigéniques avec *Bacillus cereus*, *B.subtilis* et *B. megaterium* par la technique de l'épuisement des sérums anti *B.anthraxis* à l'aide de suspensions de ces trois bactéries, il est possible d'obtenir un réactif qui ne reconnaît plus que *Bacillus anthracis* (Michel *et al.*, 1973).

De même en immunofluorescence, des communautés antigéniques avec ces mêmes bactéries ont été enregistrées (Broome, S et Gilbert, 1978).

L'épuisement des sérums anticharbonneux les rend spécifiques de *Bacillus anthracis* sous forme bacillaire, mais non sous forme sporulée.

La toxine de nature protéique sécrétée par *Bacillus anthracis* se compose de trois facteurs qui pris globalement sont atoxiques :

- L'antigène protecteur (PA) ou facteur II ou facteur immunogène, d'un poids moléculaire égal à 83 Kilodaltons,
- Le facteur léthal (LF) ou facteur III d'un poids moléculaire égal à 85 Kilodaltons,
- Le facteur oedématogène (EF) ou facteur I de poids moléculaire égal à 89 Kilodaltons.

Ces trois protéines sont respectivement codées par les gènes (*pag*, *lef* et *cya*) (Leppa, S, H, ; 1982), tous trois portés par le plasmide de toxicité PXO1 de 185 Kpb (Brossier F *et al.*, 2002).

Ces toxines sont responsables des effets physiopathologiques observés au cours de l'infection (Pezard, C., *et al.*, ; 1991).

L'action atoxique de diverses souches peut varier suivant la production respective de ces trois facteurs.

Les différents antigènes de *Bacillus anthracis* donnent lieu à la présence dans l'organisme infecté d'anticorps de signification biologique différente mis en évidence par diverses réactions sérologiques après l'infection.

2.7. Diversité génétique de souches de *Bacillus anthracis*

Cette revue de la littérature, vise à ériger une phylogénie de diverses souches de *Bacillus anthracis*. Son ambition finale est d'établir, pour une souche dont la provenance est inconnue, son origine géographique par analogie avec des souches semblables préalablement analysées.

Il existe un arbre phylogénétique de différentes espèces de *Bacillus* établi selon une méthode donnée par exemple, plusieurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont validés sur plusieurs souches fournissant un profil SNP pour chaque souche, on établit un profil spécifique de la souche

détectée que l'on positionne ensuite dans l'arbre phylogénétique (figure 4). Cet arbre montre que *Bacillus anthracis* est proche phylogénétiquement de *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. mycoides*.



Figure 4: Arbre phylogénétique des espèces de *Bacillus* basé sur les séquences d'ARNr 16S
Keim., P et al 2000)

Différentes techniques existent pour mettre en évidence la diversité génétique de *Bacillus anthracis*.

Par ailleurs, les séquences nucléotidiques, qui sont progressivement mises à la disposition du public, favorisent la mise en œuvre de ces techniques. Divers travaux ont été réalisés sur la variabilité génétique de cette bactérie. *B. anthracis*. Il existe différentes techniques capables d'identifier le polymorphisme du génome, en fonction de l'espèce considérée. *B. anthracis* est une espèce peu polymorphe d'un point de vue génétique. Son cycle de vie peut expliquer en partie cette faible diversité.

La sporulation nécessite une température comprise entre 15 et 42°C, une atmosphère humide et la présence d'oxygène. Lorsque les cadavres d'animaux morts de charbon ne subissent aucun

traitement particulier, les bacilles peuvent alors sporuler et se disséminer dans l'environnement. A l'état sporulé, *B. anthracis* peut survivre plusieurs dizaines d'années dans l'environnement avant d'infecter un nouveau ruminant. Les caractères génétiques sont alors conservés tant que la bactérie n'est pas revenue à un état végétatif où elle peut se multiplier (Keim, P *et al.*, 2000).

Plusieurs équipes ont étudié la diversité génétique chez *B. anthracis*. Leur principal objectif tendait à distinguer différents isolats de cette bactérie. Les méthodes qu'elles ont utilisées reposaient sur les technologies alors disponibles. Les résultats ont systématiquement été comparés à ceux obtenus pour *B. cereus*, *B. mycoïdes* et *B. thuringiensis*, espèces phylogénétiquement les plus proches de *B. anthracis* (Inglesby *et al.*, 1999). Il existe des innovations les plus récentes, au nombre desquelles figure le séquençage du génome de *B. anthracis*.

III. LES FACTEURS DE VIRULENCE

B. anthracis produit deux facteurs majeurs de virulence : une capsule et deux toxines, la toxine létale (LT, Lethal Toxin) et la toxine oedémateuse (ET, Oedema Toxin)

3.1. La capsule

3.1.1. Caractéristiques

La capsule produite par *B. anthracis* est formée d'un polymère constitué d'acide gamma – D glutamique (PGA) (Hanby et Rydon, 1946). Elle est singulière car les capsules bactériennes sont généralement polysidiques. Elle a aussi la particularité d'être composée de polymères linéaires présentant l'énantiomère D – Glutamate uniquement, ce qui la rendrait peu immunogène (Maurer, 1965 ; Goodman et Nitecki, 1967). De plus, chez *B. anthracis*, le PGA présente des liaisons gamma entre ces résidus et est ainsi résistant aux protéases qui ne clivent que les liaisons alpha – aminées des protéines (Candela et Fouet, 2006). Une élimination du plasmide portant les gènes de synthèse de la capsule diminue la virulence de la bactérie chez les herbivores et l'homme (souche Sterne). In vivo, la capsule permet à la bactérie de résister à la phagocytose et donc d'échapper au système immunitaire (Zwartouw et Smith, 1956 ; Makino *et al.*, 2002).

3.1.2 Synthèse

La synthèse de la capsule est gouvernée par l'opéron *cap BCADE* situé sur le plasmide pXO2. Les enzymes de synthèse du PGA sont codées par les gènes *cap* (*cap B*, *cap C*, *cap A* et *cap E*) et par le gène *dep* (ou *cap D*) (Candela et Fouet, 2005). Les fonctions des protéines *Cap B*, *Cap C*, *Cap A* et *Cap E*, ont été étudiées par comparaison avec leurs homologues chez *Bacillus subtilis* (*Pgs B*, *Pgs C*, *Pgs A* et *Pgs E*, respectivement) (figure 5) (Ashiuchi *et al.*, 2001).

Pgs B est impliqué dans l'élongation du PGA et présente une activité ligase (Eveland *et al.*, 1997 ; Urushibata *et al.*, 2002). Les fonctions de *Pgs C* ne sont pas encore bien élucidées, mais un mélange de *Pgs B* et *Pgs C* possède une activité ATPase, ainsi *Pgs C* participerait à la synthèse du PGA (Urushibata *et al.*, 2002). Enfin une comparaison d'alignement de séquence gène *dep* ou *capD* code pour une quatrième protéine, *CapD* (à l'origine appelée *Dep*) dont l'analyse des mutants a permis de montrer qu'elle était nécessaire à l'ancrage covalent du PGA au peptidoglycane (Candela et Fouet, 2005). Elle présente aussi une activité dépolymérase (Makino *et al.*, 2002) et joue donc un rôle dans la régulation de la taille de la capsule.

Récemment, un nouveau peptide nécessaire à la synthèse du PGA et codé par le gène *capE* a été décrit (Candela *et al.*, 2005). Ce petit peptide *CapE* joue probablement un rôle structural et interagissant avec *CapA* (voir Figure 5)

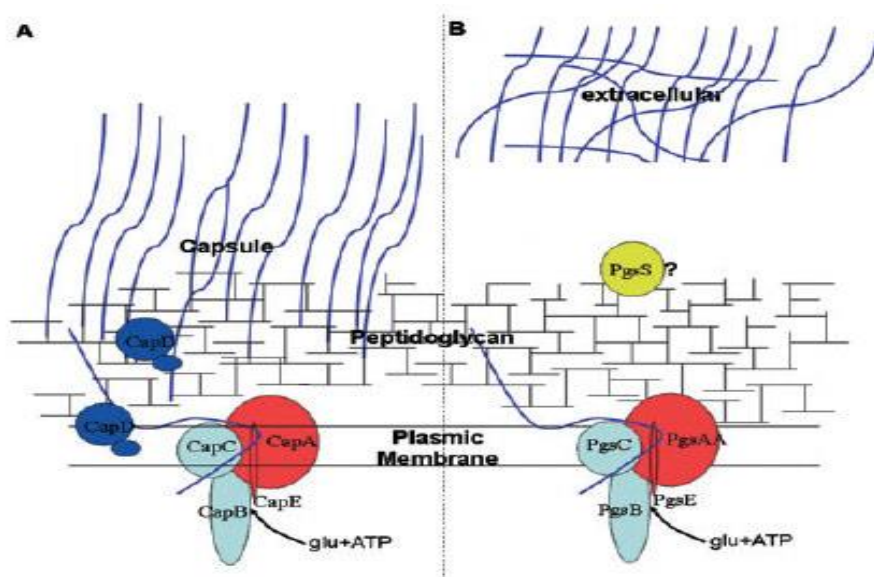


Figure 5 : Représentation schématique de la synthèse du PGA chez *B. anthracis* (A) et chez *B.*

subtilis (**B**). Chez *B. anthracis* la capsule est ancrée à la membrane tandis que chez *B. subtilis*, la capsule est sécrétée d'après (Candela et Fouet, 2006).

3.2. Les toxines

3.2.1. Aspects généraux

Les toxines du charbon sont de type A/B où la sous unité A (activity), représentée par les facteurs oedématogènes ou létal, exerce l'activité enzymatique de la toxine, et la sous unité B (binding), représentée par l'antigène protecteur, se lie aux récepteurs membranaires.

Depuis longtemps, les capacités protectrices de l'antigène protecteur (PA, protective antigen) sont connues : le nom de PA vient de l'immunité protectrice engendrée par une immunisation avec cette protéine (Gladstone, 1946; Wright *et al.*, 1954)

L'existence d'une substance toxique produite par la forme végétative de *B. anthracis* a été mise en évidence à la suite des observations de Keppie et Smith (Smith et Keppie, 1954; Keppie *et al.*, 1955; Smith *et al.*, 1955). Keppie *et al.*, ont montré que la streptomycine guérit les cobayes d'une infection jusqu'à un certain seuil de concentration de bactéries dans le sang. Quand ce seuil est dépassé, les cobayes ne peuvent plus être guéris même si le nombre de bactéries est considérablement diminué (Keppie *et al.*, 1955).

Smith *et al.*, ont démontré la présence d'un facteur létal dans le plasma de cobayes morts de la maladie du charbon en injectant ce plasma par voie intra – péritonéale (i.p) chez la souris ou le cobaye et en observant la mort des animaux 12 heures après l'injection (Smith *et al.*, 1955). Ils démontrent ainsi l'existence de substances toxiques sécrétées par les bactéries dans le sang.

Après purification du facteur III, nommé par la suite facteur létal (*LF*, lethal factor), l'action toxique de la toxine associée (*PA* + *LF*) a pu être testée et reconnue sur les modèles animaux (Stanley et Smith, 1961; Beall *et al.*, 1962). Plus récemment, il a été montré que la toxine participe à la virulence puisqu'une souche mutée pour le gène codant pour *LF* est beaucoup moins virulente chez la souris que la souche parentale Sterne (Pezard *et al.*, 1991). Il a aussi été montré qu'une

injection de 100 µg de *LF* par voie intraveineuse (i.v.) ou ip chez la souris induit des lésions de type hypoxique et la mort des animaux sans syndrome inflammatoire (Moayeri *et al.*, 2003).

De même, chez le rat, la mort induite par l'injection i.v. de 100µg de *LF* durant 24 heures ne résulte pas de la sécrétion de cytokines ni d'oxyde nitrique (NO) mais d'une hypertension (cui *et al.*, 2004).

Une injection sous cutanée du facteur oedématogène (*EF*, edema factor) associée à *PA* et formant la toxine oedémateuse, induit la formation d'un oedème (Stanley et Smith, 1961), expliquant ainsi l'étymologie du nom « facteur oedématogène ». Une étude a récemment montré que *EF* s'avère hautement létal à plus faibles doses et plus rapidement que *LF* dans un modèle murin (Firoved *et al.*, 2005). Ainsi, *EF* induit de nombreuses lésions associées à la maladie du charbon. Ces lésions sont différentes de celles induites par *LF* et comprennent une hémorragie des ganglions lymphatiques et du tractus gastro – intestinal, ainsi qu'une nécrose de nombreux tissus incluant les organes lymphoïdes, la moelle osseuse, le coeur et les reins (Firoved *et al.*, 2005). Une étude a aussi montré que *EF* peut induire une nécrose tissulaire dans un modèle Zebrafish (Voth *et al.*, 2005).

3.2.2. Caractéristiques structurales

3.2.2.1. L'antigène protecteur, PA

La protéine *PA* (83kDA) est codée par le gène *pagA* porté par le plasmide pXO1. Elle a été cristallisée en 1997 et présente 4 domaines distincts (Figure 6) (Petosa *et al.*, 1997). Le domaine 1 N-terminal contient le site de clivage protéolytique (au niveau du résidu 167), donnant naissance aux deux sous -unités PA20 et PA63 (Brossier et Mock, 2001). La portion du domaine 1 restante (résidus 168 – 258, associés à PA63), correspond au site de fixation des facteurs létal et oedématogène (Petosa *et al.*, 1997).

Les domaines centraux 2 (résidus 259 – 487) et 3 (résidus 488 – 596) sont respectivement impliqués dans la formation du pore : translocation des facteurs (Sellman *et al.*, 2001) et dans l'heptamérisation de PA63 (Mogridge *et al.*, 2001). En C-terminal, le domaine 4 (résidus 597 – 735) présente peu de contacts avec les autres domaines et est impliqué dans la liaison de *PA* à ses récepteurs cellulaires (Little et lowe, 1991).

3.2.2.2. Le facteur œdémotogène, EF

La protéine EF (89 kDA) est codée par le gène *cya* porté par le plasmide pXO1 (Robertson *et al.*, 1988). En 1982, Leppla *et al.*, démontrent que EF est une adénylate cyclase, induisant une augmentation incontrôlée d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire chez les cellules eucaryotes (Leppla, 1982). La résolution de la structure cristalline de EF a montré qu'elle ne présentait pas d'homologie structurale avec les adénylates cyclases mammifères (Drum *et al.*, 2002).

EF est composé de trois domaines globulaires (CA, CB, et le domaine hélical) et de trois boucles flexibles (Switch A, B et C) (Figure 6a) (Drum *et al.*, 2002).

Le domaine CA, au niveau N-terminal, possède une forte homologie de séquence avec le domaine 1 du facteur létal (Escuyer *et al.*, 1988; Bragg et Robertson, 1989). Cette région intervient dans la fixation à l'heptamère (PA63)₇ (Mourez *et al.*, 2002).

Les interfaces des domaines CA et CB forment le site catalytique de la protéine. En C-terminal, le domaine hélical, lié à CA via un linker, correspond au site de fixation de la calmoduline (CaM) (Labruyere *et al.*, 1990. Après fixation de la CaM, des modifications structurales au niveau des deux domaines CA, CB et des trois boucles flexibles A, B, C permettent la fixation du substrat ATP (Figure 4B) (Drum *et al.*, 2002; Mourez *et al.*, 2002)

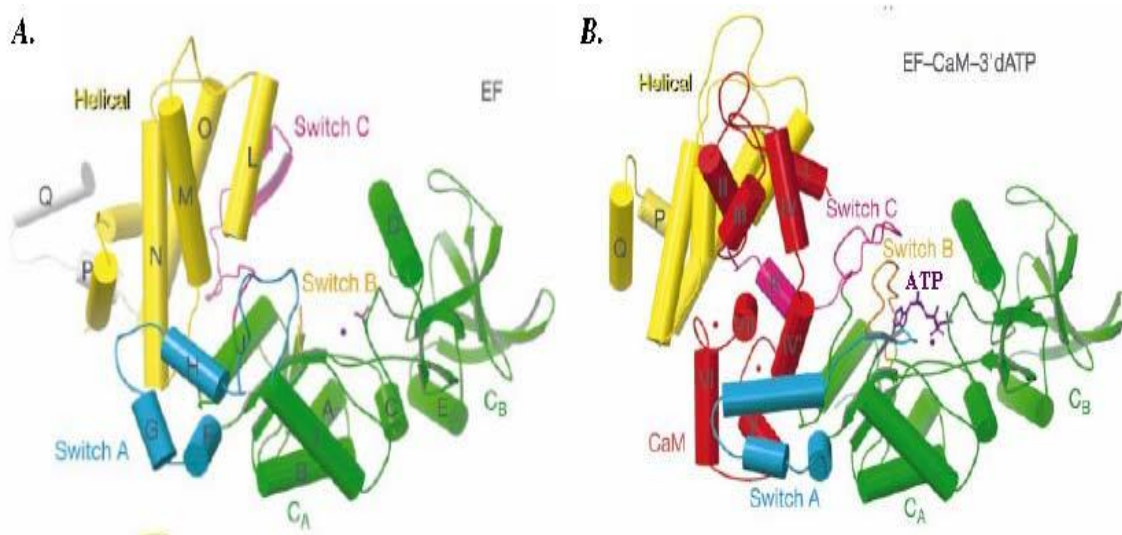


Figure 6 : Structures secondaires du facteur œdémotogène de *B. anthracis* seul (A) ou du complexe EF CaM-ATP (B) (d'après Drum *et al.*, 2002).

3.2.2.3. Le facteur létal, LF

LF est une protéine de 90kDa codée par le gène *lef* porté par le plasmide pXO1 (Bragg et Robertson, 1989). LF est une métalloprotéase contenant un motif HexxH de liaison au Zn^{2+} en résidu C-terminal (résidus 686 – 690), motif présent sur le site actif de toutes les métalloprotéases (Klimpel *et al.*, 1994).

La structure cristallographique et l'étude de mutants (LF) montrent la présence de quatre domaines (Figure 5) (Pannifer *et al.*, 2001). L'homologie de séquence avec le domaine CA de EF et impliquée dans la liaison de l'heptamère (PA63)₇ se situe au niveau N-terminal (résidus 27 – 262) et correspond au domaine 1 de LF (Arora et Leppla, 1993). Le domaine 2 de la protéine (résidus 263 – 297 et 385 – 550) forme une poche dans laquelle vient se fixer le peptide substrat. Le domaine 3 de LF est situé au sein du domaine 2 (résidus 298 – 384) et participe à la reconnaissance du substrat (Arora et Leppla, 1993; Pannifer *et al.*, 2001). Ce domaine semble correspondre à une duplication imparfaite de séquences du domaine 2 (Mourez *et al.*, 2002).

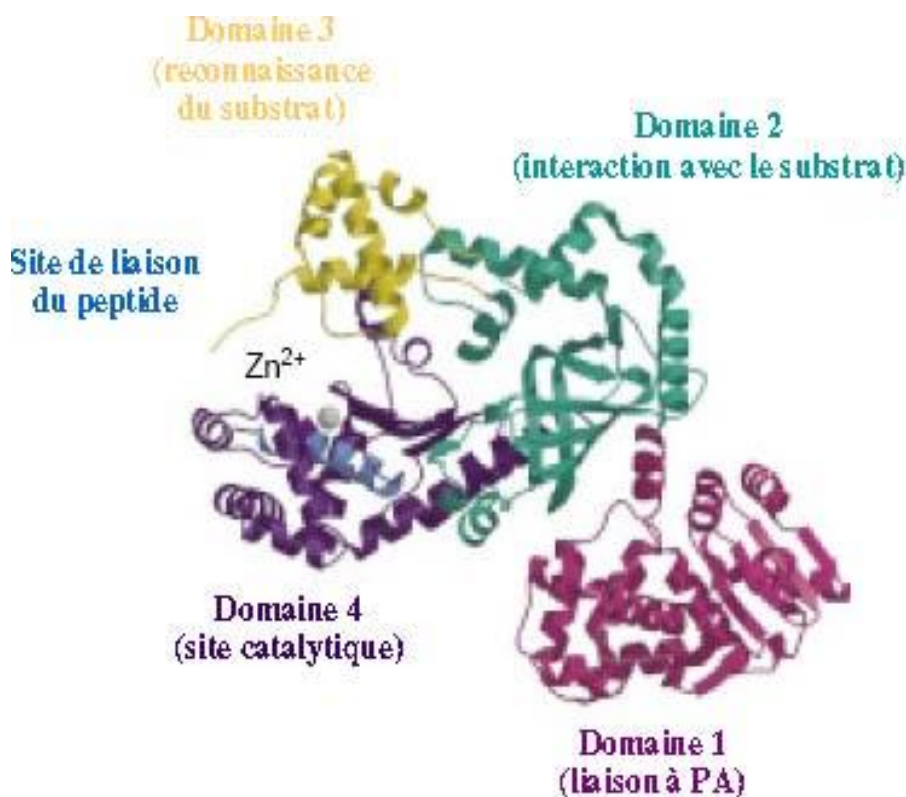


Figure 7 : Structure du facteur létal de *B. anthracis* (Mourez *et al.*, 2002)

Le quatrième domaine est formé par le segment de résidus 551 à 771 et comporte le motif classique des métalloprotéases HexxH, site catalytique de LF (Kochi *et al.*, 1994 ; Menard *et al.*, 1996b). Les domaines 2, 3 et 4 forment un sillon spécifique au substrat (Pannifer *et al.*, 2001).

3.2.3. Mécanismes d'internalisation des toxines

Lorsque les cellules épithéliales des organes (poumon, peau, transit intestinal) constituant le site d'entrée de *B. anthracis* sont incubées avec les facteurs EF et LF seuls (en absence de PA), aucune cytotoxicité n'est observée. Différents acteurs sont effectivement impliqués dans l'internalisation des deux facteurs sécrétés par *B. anthracis*.

3.2.3.1. Récepteurs cellulaires

Deux récepteurs cellulaires de PA sont actuellement décrits : le marqueur TEM8 (tumor endothelial marker 8) ou ANT XR1 (anthrax toxin receptor 1) (Bradley *et al.*, 2003), et la protéine CMG2 (human capillary morphogenesis protein 2) ou ANT XR2 (Scobie *et al.*, 2003). Les deux récepteurs possèdent un domaine transmembranaire de type 1 et un domaine conservé de type VWA (facteur non Willbrand de type A) extracellulaire possédant un motif MIDAS (metal ion-dependant adhesion site) directement impliqué dans la liaison avec PA (Bradley et Young, 2003; Lacy *et al.*, 2004b). ANT XR1 est exprimé par les cellules épithéliales des organes constituant les sites d'entrée de *Bacillus anthracis*, c'est à dire les poumons, la peau et le tractus intestinal (Boucelli *et al.*, 2005).

ANT XR1 est aussi exprimé par les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains activées par la prostaglandine E2 (PGE2), médiateur lipidique sécrété par les cellules épithéliales alvéolaires (Riccobon *et al.*, 2006). De plus, les travaux récents ont montré que la surexpression d'ANT XR1 par une lignée de macrophages murins, entraîne la mort des cellules par apoptose après incubation avec PA seul et de façon caspase 3-dépendante (Salles *et al.*, 2006). Cette cytotoxicité serait due à la formation de pores et à la libération de protéines lysosomiales dans le cytosol. ANT XR2, quant à lui, est exprimé dans de nombreux tissus (Scobie *et al.*, 2003). le rôle physiologique de ce récepteur dans la mort associée à LT a été démontré chez le rat (Scobie *et al.*, 2006).

Récemment une nouvelle protéine nécessaire aux mécanismes d'endocytose des toxines a été identifiée, la LRP6 (low -density-lipoprotein receptor – related protein 6) (Wei *et al.*, 2006). Cette protéine, impliquée dans la voie de signalisation *Wnt* importante dans la régulation de l'embryogenèse, est capable d'interagir avec les deux protéines récepteurs de PA et joue le rôle de co- récepteur dans l'internalisation des toxines (Figure 8).

De même, des travaux ont montré que des cellules n'exprimant pas *ARAP3* (*Arf and Rho* GTPase activating protein 3), une protéine liant les phosphoinositides, deviennent résistantes à une intoxication (Lu *et al.*, 2004). Les liens entre ces différents éléments et leur participation dans l'internalisation des toxines restent encore à élucider.

3.2.3.2. Formation du pore

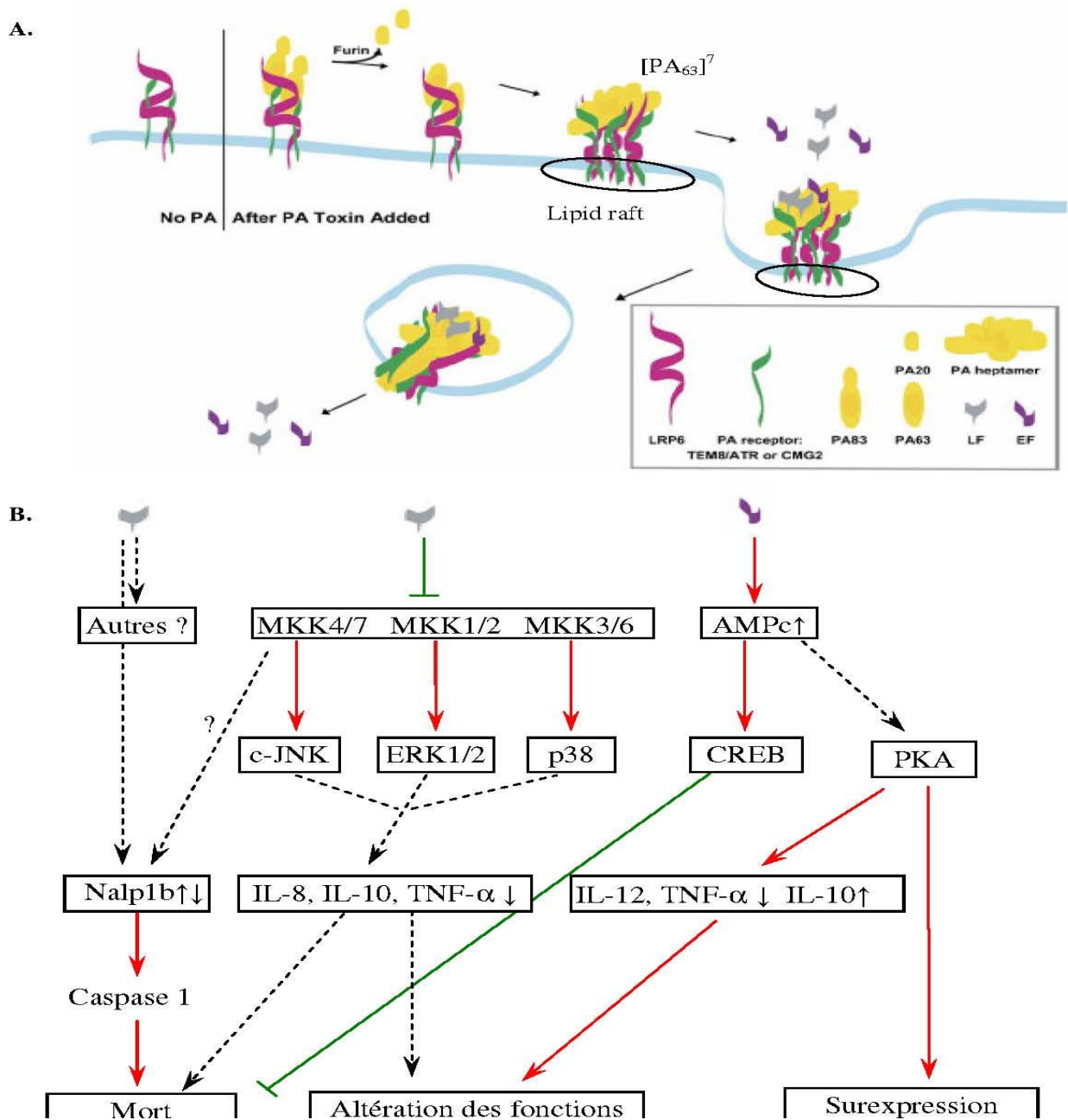
La liaison PA- récepteur induit le clivage de PA par une protéase cellulaire de type furine (Klimpel *et al.*, 1992), produisant un fragment soluble de 20 KDA (PA20) et un fragment de 63 KDA (PA63) associé aux récepteurs via son domaine C-terminal (Figure 9). Plusieurs complexes PA63-récepteurs s'assemblent alors pour former un heptamère appelé pré-pore (PA63)₇ (Petosa *et al.*, 1997 ; Abrami *et al.*, 2003). L'heptamère peut lier jusqu'à trois molécules de EF et/ou LF (Mogridge *et al.*, 2002 ; Pimental *et al.*, 2004).

Les complexes toxines- récepteurs se localisent au niveau de rafts lipidiques et sont internalisés par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant (Figure 8A) (Abrami *et al.*, 2003).

Ils sont ensuite associés aux endosomes précoces dont les régions multivésiculaires se détachent pour devenir des transporteurs intermédiaires ou multivesicular bodies (MVB) qui sont transportés le long de microtubules jusqu'à la région périnucléaire où ils fusionnent avec les endosomes tardifs (Abrami *et al.*, 2005).

La progression des vésicules depuis les endosomes précoces et jusqu'aux endosomes tardifs expose la pré - pore à un environnement de plus en plus acide (Friedlander, 1986 ; Menard *et al.*, 1996a ; Abrami *et al.*, 2004). L'acidification induit une modification conformationnelle au sein du domaine 2 des sept sous unités PA63 de l'heptamère formant alors un pore (Lacy *et al.*, 2004a). La translocation des facteurs dans le cytosol à travers ce pore nécessite un dépliement complet des protéines (Krantz *et al.*, 2004). La différence de pH entre les endosomes et le cytosol est un facteur nécessaire dans le mécanisme de translocation de EF et LF (Krantz *et al.*, 2006).

Le rôle des récepteurs ANTXR1 et 2 dans la formation du pore a été démontré (Lacy *et al.*, 2004a ; Santelli *et al.*, 2004). Ainsi, un relâchement entre le récepteur et le domaine 2 de PA semble nécessaire à la formation du pore (Scobie et Young, 2005), dissociation qui nécessite un pH différent selon que PA est associé à ANTXR1/TEM8 ou ANTXR2/CMG2 (Rainey *et al.*, 2005). EF reste associé à la membrane des endosomes tardifs et présente ainsi une activité concentrée au niveau périnucléaire (site de localisation des endosomes tardifs) tandis que *LF* est relargué dans le cytosol (Guidi-Rontani *et al.*, 2000 ; Dal Molin *et al.*, 2006).



Actions cellulaires d'ANTXR1

Figure 8: Mécanismes d'internalisation et mode d'action intracellulaire des toxines : **A**, acteurs de l'internalisation des toxines (d'après (Wei *et al.*, 2006) ; **B**, cibles intracellulaires du facteur létal et du facteur œdématogène (d'après (Banks *et al.*, 2006) et (Tournier *et al.*, 2007)).

3.2.4. Mode d'action des toxines

3.2.4.1. La toxine létale

Le facteur létal de *B. anthracis* est une métalloprotéase spécifique des mitogen activated protein kinase (MKK) (Figure 6 B). *LF* clive ces enzymes entre la partie N-terminal et leur domaine catalytique (Duesbery *et al.*, 1998 ; Vitale *et al.*, 1998) via la reconnaissance d'une séquence partiellement conservée de la partie C-terminale des kinases (Chopra *et al.*, 2003). Les MKK sont des activateurs directs des mitogen-activated protein kinases (MAPK) dans la cascade de signalisation intracellulaire connue sous le nom de « voie des MAPK ». Le domaine N-terminal des MKK est nécessaire à l'interaction et à la phosphorylation des MAPK, et le clivage protéolytique de ce domaine par *LF* bloque l'activation des MAPK (Duesbery *et al.*, 1998). *LF* inhibe ainsi les MKK1, 2 (Duesbery *et al.*, 1998 ; Vitale *et al.*, 1998), 3 (Pellizzari *et al.*, 1999), 4,6 et 7 (Vitale *et al.*, 2000). De ce fait, les trois voies majeures de signalisation en aval des MKK sont dérégulées : les voies ERK (extracellular- signal regulated kinases) -1 et -2, la voie c-JNK (c-jun N-terminal kinase) et la voie p38 (Figure 9). Chacune de ces voies joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire (Dong *et al.*, 2002).

3.2.4.2. LT et mort cellulaire

De grandes variations de sensibilité à la toxine létale entre différentes espèces ont été observées. En 1986, Friedlander *et al.*, montrent que les macrophages péritonéaux de souris C3H/HeN sont rapidement lysés après une exposition d'une heure à la toxine létale tandis que des macrophages issus de certaines lignées cellulaires s'avèrent résistants (Friedlander, 1986). L'inhibition de la voie des MAPK ne semble cependant pas être impliquée dans la sensibilité des macrophages puisqu'il a été montré que l'internalisation du facteur létal, sa délivrance dans le cytosol (Friedlander *et al.*, 1993) et le clivage des MKK (Pellizzari *et al.*, 1999) sont des phénomènes retrouvés dans les deux cas de sensibilité des macrophages murins. Une étude a montré que *LT* active la protéasome dans le cytosol des macrophages murins, conduisant à la dégradation des molécules essentielles pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et à la lyse des cellules (Tang et Leppla, 1999).

Cette activation s'effectue en aval du clivage des MKK mais le mécanisme impliqué reste à déterminer. Il pourrait alors expliquer les différences de sensibilité des macrophages murins observés selon leur origine (Friedlander, 1986 ; Sing *et al.*, 1989).

Afin de comprendre les différences de sensibilité des macrophages murins, un facteur génétique a été recherché. Le locus *Ltxs1/Kif1C*, situé sur le chromosome 11, a été identifié dans le contrôle de la susceptibilité des souris à la toxine létale (Roberts *et al.*, 1998).

Récemment, le gène directement impliqué a été identifié et s'avère lié au gène polymorphique *Nalp 1b* (Boyden et Dietrich, 2006). *Nalp1b* est un composant-clé de l'inflammasome et un activateur de la caspase-1 (Figure 8B). Son activation induit la production de cytokines pro – inflammatoires telles que l'interleukine (IL) et l'IL -18 et mène à la mort cellulaire (Tschopp *et al.*, 2003 ; Petrilli *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que la mort induite par *LT* peut être indépendante de l'inhibition de la voie des MAPK.

D'autres travaux chez la souris montrent que *LT* induit une mort par apoptose via des cibles intracellulaires directes ou indirectes. En 2002, Park *et al.*, montrent pour la première fois que *LT* induit l'apoptose des macrophages activés dérivés de la moelle osseuse de souris *BALB/c*, directement via l'inhibition de la voie p38 MAPK (Park *et al.*, 2002).

Dans le même temps, Popov *et al.*, observent l'activation des caspases -1,-2,-3,-4,-6 et -8 dans des lignées de macrophages murins suite à une exposition à *LT* menant à l'apoptose de ces macrophages (Popov *et al.*, 2002b). L'activité pro-apoptotique de *LT* est aussi liée à sa capacité de supprimer les signaux de survie engendrés par l'engagement de TLR4 (Toll-like receptor 4) et médiés par la voie p38 MAPK qui active l'expression de gènes de survie via l'activation du nuclear factor (NF)-kB. En clivant les MKKs, et particulièrement les MKK3/6, *LT* bloque l'activation de la voie p38 MAPK et de NF-kB, conduisant à l'apoptose des macrophages (Figure 8B) (Park *et al.*, 2005).

Une autre étude montre que *LT* inhibe l'expression de la *GSK3Béta* (glycogen synthetase kinase 3 Béta), une protéine impliquée dans la régulation positive de la survie cellulaire (Tucker *et al.*, 2003), mais ces travaux ne permettent pas d'exclure le rôle joué par l'inhibition de la voie des MAPK dans la mort cellulaire.

LT semble donc avoir un effet direct sur la viabilité des macrophages murins. Plus récemment, une autre voie apoptique induite par *LT* a été décrite impliquant l'activation des TLR4 par *B. anthracis* via l'activation des PKR (RNA-dependent protein kinase) (Hsu *et al.*, 2004).

Enfin un autre mécanisme de susceptibilité à *LT* a été proposé chez la souris : le *TNF* (tumor necrosis factor) – alpha, produit lors d’une infection, active les macrophages qui deviennent alors sensibles à la mort induite par *LT* (Kim *et al.*, 2003).

Les macrophages et les cellules endothéliales humaines et animales présentent une sensibilité à la toxine létale qui se traduit par une mort par apoptose (Popov *et al.*, 2002a ; Kirby, 2004 ; Pandey et Warburton, 2004). Les données concernant la mort des cellules dendritiques humaines induite par *LT* sont discordantes.

Deux études montrent que *LT* ne présente pas d’effets toxiques sur les cellules dendritiques humaines (Agrawal *et al.*, 2003 ; Quesnel Hellmann A., communication personnelle), tandis qu’une troisième observe une mort par apoptose très similaire à celle induite sur des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris C57BL/6 (Agrawal *et al.*, 2005).

3.2.4.3. Effets de LT sur les fonctions cellulaires

Les effets de la toxine létale sur les fonctions cellulaires sont nombreux et ubiquitaires.

LT inhibe la production de radicaux oxygénés (ROS, reactive oxygen species) par les polynucléaires neutrophiles (PNN) humains (Crawford *et al.*, 2006) et bloque leur activation (Wright et Mandell, 1986) ainsi que leur recrutement par chimiotactisme (During *et al.*, 2005).

LT bloque la prolifération et la différenciation des monocytes humains (Kassam *et al.*, 2005). De plus, des travaux ont montré que les sécrétions de *TNF* –alpha, d’IL-1 bêta, produites par les macrophages murins activés, sont inhibées suite à une incubation avec *LT* (Pellizzari *et al.*, 1999 ; Erwin *et al.*, 2001).

Une étude similaire sur des macrophages dérivés des monocytes humains confirment ces résultats (Popov *et al.*, 2002a). En 2004, Dang *et al.*, montrent que *LT* inhibe l’activation de la protéine *IRF-3* (interferon-regulatory factor – 3) chez les macrophages humains et murins activés par du lipopolysaccharide (LPS) (Dang *et al.*, 2004).

IRF-3 participe à l'induction transcriptionnelle de nombreuses cytokines et chimiokines. *LT* inhibe en fait un grand nombre de gènes impliqués dans la transduction du signal, la production d'enzymes ou encore dans le métabolisme protéique des macrophages (Comer *et al.*, 2005b).

De même, la production de phospholipase A2 (PLA2) type IIA, une enzyme effectrice de la réponse immune innée avec une activité bactéricide produite par les macrophages alvéolaires, est inhibée lors d'une incubation avec *LT* chez le cobaye (Gimenez *et al.*, 2004). Tous ces phénomènes inhibent la réponse inflammatoire et favorisent la prolifération du pathogène lors des phases précoces de l'infection.

LT inhibe la réponse immune cellulaire et plus particulièrement la présentation des antigènes (Ag) par les cellules dendritiques murines dérivées de la rate en bloquant l'expression des molécules de co-stimulation et en inhibant la sécrétion de l'ensemble des cytokines (Agrawal *et al.*, 2003). A l'inverse, une étude similaire portant sur des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris *BALB/c* et *C57BL/6* ne montre pas d'inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation et montre des effets sélectifs sur la sécrétion des cytokines avec une inhibition de la sécrétion de TNF-alpha et d'IL-10 mais pas de l'IL-12 (Tournier *et al.*, 2006). Chez l'homme, *LT* inhibe à la fois la maturation des cellules dendritiques et la sécrétion de chimiokines telles que CXCL (CXC- chemokine ligand) 8 (ou IL8), jouant un rôle prépondérant dans le recrutement des monocytes/PNN, ou encore CCL (CC-chemokine ligand) 2 et CCL5 jouant un rôle dans le recrutement de cellules T (Quesnel Helmann, communication personnelle).

LT cible la réponse cellulaire en inhibant l'activation et l'expression des molécules de surface telles que le CD69 et le CD25 (Paccani *et al.*, 2005), ainsi que la prolifération et la production de cytokines telle que l'IL – 2 (Fang *et al.*, 2005) par les cellules T humaines. Une étude similaire menée chez la souris a montré que *LT* inhibe l'activation des lymphocytes T *in vivo* (Comer *et al.*, 2005).

L'immunité humorale est aussi affectée. Des dysfonctionnements sévères sont observés à la fois chez l'homme et chez la souris sur des cellules B après intoxication avec *LT*. Leur prolifération en réponse à divers stimuli est fortement diminuée ainsi que leur capacité de production d'immunoglobulines - IgM (Fang *et al.*, 2006).

Enfin, *LT* augmente l'expression de la protéine membranaire VCAM (vascular cell adhesion molecule) -1 par les cellules endothéliales humaines activées, molécule responsable de l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire (Steele *et al.*, 2005). Elle augmente aussi la perméabilité de la barrière endothéliale en modifiant la distribution des VEC adhérentes, molécules impliquées dans les jonctions adhérentes (Warfel *et al.*, 2005). *LT* engendre la lyse des hématies en présence de PNN (Wu *et al.*, 2003), inhibe la coagulation sanguine et supprime l'agrégation plaquettaire in vitro (Kau *et al.*, 2005).

Tous ces événements pourraient être à l'origine des hémorragies et des effusions pleurales retrouvées cliniquement.

3.2.4.3. La toxine oedémateuse

En 1982, il est établi que *EF* est une adénylate cyclase calcium-calmoduline dépendante induisant une augmentation incontrôlée d'AMPc intracellulaire (Leppla, 1982 ; Leppla, 1984 ; Ulmer *et al.*, 2003). L'activité adénylate cyclase de *EF* est 1000 fois plus élevée que celle des adénylates cyclases eucaryotes (Banks *et al.*, 2006).

Peu de travaux ont été réalisés sur les mécanismes d'action et le rôle de la toxine oedémateuse lors d'une infection par le bacille du charbon, probablement en raison des différences observées avec la toxine médiée par *LT*, et sans doute aussi par la difficulté d'obtenir des quantités suffisantes de toxine purifiée pour des études in vivo. Cependant, dès 1985, une étude montre que *ET* est capable d'inhiber la phagocytose des bacilles par les PNN humains in vitro (O'Brien *et al.*, 1985). La toxine oedémateuse joue donc probablement un rôle important dans la physiopathologie de la maladie que ce que l'on pensait jusqu'alors.

Par la suite, il a été montré que *ET* bloque l'activation des PNN (Wright et Mandell, 1986) ainsi que leur activité NADPH (nicotine adénine dinucléotide phosphate reduced) oxydase (Crawford *et al.*, 2006).

ET modifie aussi les fonctions des cellules dendritiques murines en bloquant leur sécrétion de TNF-alpha et d'IL-12 après activation (Tournier *et al.*, 2006), et inhibe l'activation des cellules T humaines (Paccani *et al.*, 2005).

ET supprime l'agrégation plaquettaire confirmant son activité adénylate cyclase invasive (Alam *et al.*, 2006). Dans les phases tardives de la maladie, des bactéries sont présentes dans de nombreux tissus mais les mécanismes impliqués dans cette propagation sont mal connus. La modification du cytosquelette cellulaire induite par *ET* sur de nombreuses cellules de mammifères peut conduire à des jonctions serrées plus faibles et ainsi permettre une pénétration plus aisée de la bactérie dans les tissus (Hong *et al.*, 2005).

Dernièrement, une étude a montré que *ET* induit une augmentation de l'expression des récepteurs ANTXR1 et -2 dans des lignées de macrophages murins et du récepteur ANTXR2 dans les cellules dérivées de monocytes humains (Maldonado- Arocho *et al.*, 2006).

Cette augmentation de l'expression des récepteurs à la surface des cellules favoriserait secondairement l'entrée des toxines.

Un autre travail a démontré que *ET* est aussi capable d'inhiber l'apoptose cellulaire induite par TLR4 via l'activation de la protéine kinase A (PKA) et de CREB (cyclic AMP response element-binding), une molécule essentielle à la survie des macrophages (Park *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont permis de démontrer l'action synergique des deux toxines (*ET* et *LT*) in vivo pour la virulence (Pezard *et al.*, 1991) et in vitro pour inhiber les fonctions des cellules dendritiques murines (Tournier *et al.*, 2006). L'association de deux toxines agit donc sur de nombreuses cibles et neutralise tous les compartiments cellulaires de l'immunité innée, affectant des étapes cruciales de la signalisation cellulaire (Baldari *et al.*, 2006).

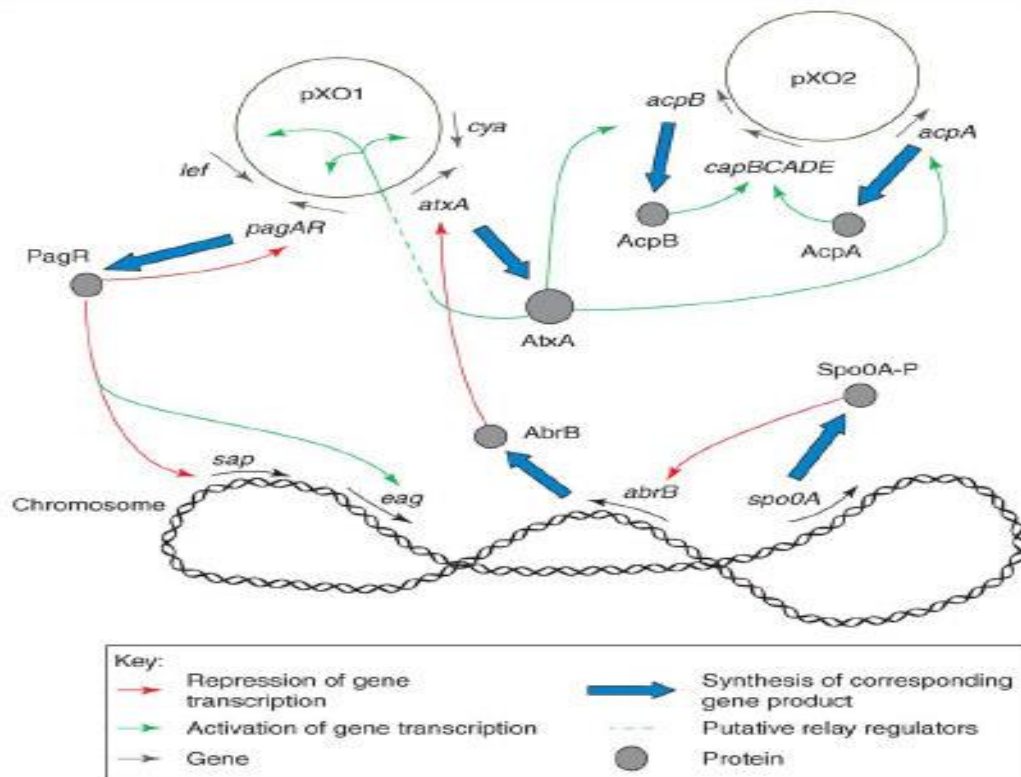


Figure 9 : Représentation schématique du système de régulation connu des gènes de virulence chez *B. anthracis* (d'après Fouet et Mock, 2006)

3.2.5. Régularisation de l'expression des gènes majeurs de virulence

L'étude de la régulation des gènes chez *B. anthracis* se fait principalement par inactivation de gènes ou par comparaison avec des gènes du type *B. cereus* (Figure 9). – voir plus haut.

Le plus fort taux de transcription de l'opéron de synthèse de la capsule a lieu dans un milieu équilibré en CO₂/bicarbonate (Fouet et Mock, 1996).

Acpa et *Acpb*, dont les gènes sont situés sur le plasmide pXO2, sont deux activateurs transcriptionnels de l'opéron *capBCADE*. *AcpA* et *AcpB* sont eux mêmes soumis à une régulation dirigée par la présence de CO₂, jouant le rôle de co-activateur, et de *AtxA*, une protéine

trans-activatrice régulant la majorité des gènes de virulence de *B.anthraxis* (Mignot *et al.*, 2003 ; Mock et Mignot, 2003).

Le plus fort taux de transcription des gènes des toxines a lieu à 37°C dans un milieu équilibré en CO₂/bicarbonate (Sirard *et al.*, 1994) et se situe à la phase exponentielle de croissance du microorganisme (Mock et Mignot, 2003). Atx est l'activateur de transcription des trois gènes codant les toxines (*pagA*, *lef* et *cya*) situés sur le plasmide pXO1 (Fouet et Mock, 2006). Le mécanisme exact de régulation des gènes est très complexe et implique d'autres molécules régulatrices dont AbrB qui réprime l'expression des AtxA (Strauch *et al.*, 2005).

Les conditions optimales de croissance et de synthèse des facteurs de virulence de *B. anthracis* sont très proches des conditions rencontrées au sein de l'hôte.

IV. CARACTERISTIQUES DE L'INFECTION

4.1. Epidémiologie

Environ 2 000 cas humains de charbon cutané sont actuellement déclarés dans le monde chaque année. (Piroth.L, *et al.*, 2010)

Aux Etats-Unis, 409 cas ont été déclarés de 1951 à 2000, dont 18 par inhalation.

En France, depuis 2002, 4 cas d'infections humaines de même que 61 foyers de fièvre charbonneuse animale à *B. anthracis* ont été identifiées. En 2003, un cas de charbon cutané a été diagnostiqué chez un patient contaminé ayant manipulé de la laine de mouton en Algérie. En 2008, 3 cas de charbon cutané ont été identifiés chez des hommes adultes ayant dépecé et éviscéré une même vache charbonneuse : ces 3 cas ont évolué de manière favorable sans complications. (Piroth.L, *et.al.*, 2010).

Quelques épidémies limitées ont été décrites en Afrique et en Asie :

Si la maladie du charbon n'a plus un impact majeur dans les pays développés, quelques foyers sont susceptibles d'apparaître occasionnellement dans nos pays en développement. Ainsi quatre cas ont été signalés au Sénégal et en Gambie dont deux dans la région des Niayes vache « *Holstein* » importée, (ferme de Wayembam) et un mouton « *touabire* » (ferme laitière de Wayembam) de même qu'une autruche du parc forestier et zoologique de Hann à Dakar. Il est aussi à signaler un cas en République de Gambie chez un bovin de race « *Ndama* » trypanotolérante (laboratoire Central vétérinaire d'Abuko) mort à la suite d'infection. (Résultats du diagnostic courant LMPA, 2008, 2010).

Au Sénégal : de l'année 2000 à l'année 2011, une trentaine de cas d'anthrax ont été diagnostiqués positifs, précisément au LNERV et ont concerné une vingtaine de bovins et une dizaine de petits ruminants (moutons et chèvres) dans trois principales régions à savoir celle des Niayes de Dakar, de Ziguinchor, et de la région de Saint Louis.

Des cas de charbon ont été diagnostiqués positifs par le LNERV, en 2008, 2009, 2010, 2011, 2013, 2014 sur des chevaux de certains Harras basés dans la localité de Rufisque, où des mortalités importantes ont été notées (Rapport Annuel, LNERV – ISRA, 2008, 2009, 2010, 2011, 2013, 2014).

Au Bénin, le charbon a été diagnostiqué positif par le LNERV à partir de prélèvements sanguins réalisés sur bovins de race « Borgou » localisés au niveau « des champs maudits » de certaines régions du pays en 2009 (Rapport annuel – LNERV – ISRA).

A l'inverse de cette infection occasionnelle, on a noté qu'elle a été endémique dans les cheptels des pays de l'Europe de l'Est, du pourtour méditerranéen, de l'Asie du Sud Est, d'Afrique et de l'Amérique du Sud. L'organisation mondiale de la Santé (OMS) estime entre 100 000 et 200 000 cas humains par an (Bulletin OMS, 2012).

Les risques de voir apparaître des cas de charbon chez l'homme et l'animal dans les pays en développement sont liés à plusieurs facteurs notamment la méconnaissance de la maladie par les éleveurs, l'abandon de la vaccination dans certaines zones, des raisons économiques qui mènent à ne pas rechercher de manière systématique les causes de la mort d'animaux dans un cheptel, le non enlèvement des carcasses lors de la mort non définie et tout particulièrement en raison du coût, le non enlèvement des carcasses des petits ruminants, la reprise des abattages clandestins avec la consommation familiale de la viande, la reprise des enfouissements clandestins dans certaines localités, l'oubli de l'emplacement exact des « champs maudits » (emplacement de l'enfouissement de carcasses d'animaux contaminés) :

Ces éléments constituent ainsi des causes de résurgence possible de la maladie du charbon dans nos pays en développement.

Tous ces éléments font que la maladie du charbon reste présente dans de nombreux pays et pourrait resurgir sporadiquement au sein des cheptels des pays en voie de développement que des pays développés (Patra *et al.*, 1998).

Depuis fin 2009, 15 cas confirmés de maladie du charbon ont été signalés chez des consommateurs d'héroïne, 14 en Ecosse et 1 en Allemagne, dont 8 mortels.

La dernière en août 2010 au Bangladesh a touché plus de 300 personnes. (Piroth.L, *et.al.* 2010).

Le charbon par inhalation est un cas exceptionnel. Le charbon en tant qu'arme bactériologique a été observé en 1979, une épidémie massive de charbon d'inhalation se déclara à Sverdlosk (ex-URSS) à quelques kilomètres d'un centre militaire de recherche.

L'épidémie liée à la diffusion accidentelle d'un aérosol de moins d'un gramme de spores sèches de charbon tua 68 personnes (Piroth.L, *et.al.*, 2010).

En 2001, aux Etats-Unis, des spores du *Bacillus anthracis* ont été intentionnellement distribuées par le système postal, causant 22 cas de charbon dont 5 décès (Piroth.L, *et.al.*, 2010)

En milieu professionnel, des cas de charbon sont reconnus en maladie professionnelle en France au régime agricole : 1 cas en 2001, 3 en 2003, 5 respectivement en 2004 et 2005, alors qu'aucun cas n'a été reconnu au régime général depuis 1999.

Les CDC (Center for Diseases Control) relatent entre 1955 et 1999, 236 cas de charbon dont 65% (153) étaient rapportés au travail de la laine ou de peaux d'animaux.

Aux Etats-Unis, 18 cas ont été décrits de 1900 à 1978. La plupart sont survenus chez des professionnels de la laine ; 2 étaient des contaminations de laboratoire. D'autres cas ont également été décrits au Royaume uni chez des trieurs de laine au début du 20^{ème} siècle.

Enfin, on a noté des cas de charbon dus à l'utilisation ou à la fabrication d'instruments à percussion en cuir brut provenant d'Asie ou d'Afrique.

4.2. Ecologie

4.2.1. Habitat

Chez l'homme, la porte d'entrée la plus fréquente est constituée par de petites blessures cutanées : après 1 à 3 jours d'incubation apparaît une petite vésicule ("pustule maligne") qui s'entoure d'une zone œdématisée où peuvent apparaître des vésicules secondaires. Il n'y a guère de suppuration, mais les vésicules se transforment en escarres recouvertes d'une croûte noirâtre. À ce stade, la maladie est parfaitement curable (mortalité inférieure à 1 % des cas traités) mais si elle n'est pas reconnue, la généralisation par voie lymphatique survient après quelques jours et la septicémie

devient rapidement mortelle. La porte d'entrée digestive (consommation de viande d'un animal charbonneux) n'existe que dans les pays à hygiène déficiente.

4.2.2. Mode de Transmission

Dans le contexte de transmission « naturelle », l'homme est contaminé lors d'exposition aux animaux malades ou aux produits animaux contaminés.

Chez l'animal : l'infection se fait essentiellement par voie digestive (ingestion de fourrages pollués).

Chez l'homme : l'infection se produit le plus souvent par la voie cutanée (maladie professionnelle). Une contamination accidentelle peut se produire suite à la consommation de viande provenant d'animaux abattus pendant l'incubation ou l'évolution du charbon.

La durée d'incubation varie selon le mode de contamination, la dose infectieuse reçue, la virulence de la souche et l'état de santé préalable du sujet. La maladie humaine existe sous trois formes : cutanée, d'inhalation ou gastro-intestinale. Cette transmission survient :

- par contact cutanée ou muqueux avec des spores présentes sur des matériels, animaux ou produits animaux contaminés : 2 à 3 jours et jusqu'à 12 jours,
- par inhalation d'un aérosol de spores pénétrant dans les alvéoles pulmonaires et transportées par voie lymphatique dans les ganglions médiastinaux. La germination des spores à ce niveau, libère des toxines provoquant hémorragie, œdème et nécrose des tissus ; 1 à 5 jours et jusqu'à 60 jours (spores restant quiescentes dans les voies respiratoires),
- par ingestion de produits contaminés. La germination des spores puis la multiplication des bacilles, libère les toxines à différents niveaux du tube digestif : bouche, œsophage ou intestin : 3 à 7 jours.

4.2.3. Répartition géographique

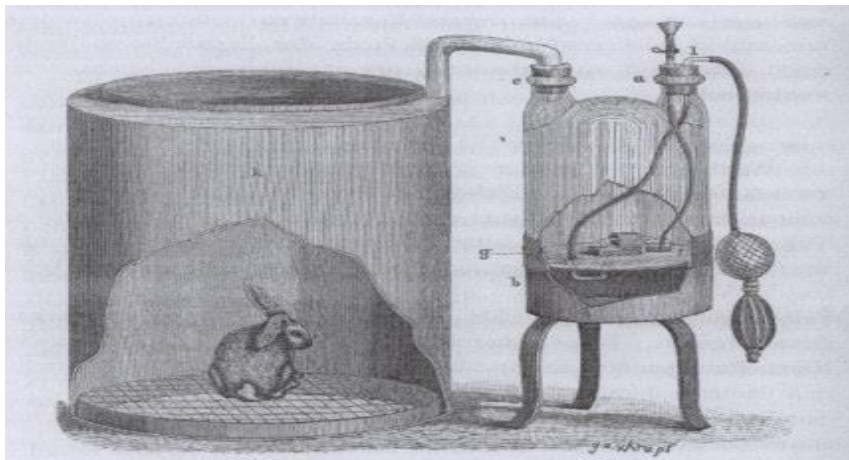
Les cas humains de charbon sont rares, mais sévères. La maladie du charbon touche surtout les animaux des régions agricoles, notamment en Amérique du Sud et centrale, en Europe du Sud et de l'Est, en Asie, en Afrique, aux Caraïbes et au Moyen-Orient. En Suisse, l'infection d'un être humain a été observée pour la dernière fois en 2004.

4.3. Physiopathologie

La physiopathologie de la maladie du charbon reste mal connue encore de nos jours. Le lien entre les événements moléculaires et la réponse physiologique de l'animal est complexe. L'étude de modèles animaux permet de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une infection par inhalation.

4.3.1. Premières études et aspects cliniques chez les rongeurs

Dès 1888, Buechner expérimente une infection par inhalation chez le lapin, le cobaye et la souris en plaçant les animaux dans une chambre d'inhalation (Figure 10) (Buechner, 1888). Il démontre ainsi que la dose de spores nécessaire pour obtenir la létalité lors d'une infection par inhalation est plus faible que lors d'une infection par voie gastro-intestinale. Il effectue une cinétique de prélèvements de tissu pulmonaire afin de retrouver le site de germination et de multiplication des spores avant leur passage dans la circulation sanguine (Buechner, 1888). Il ne trouve qu'un seul



agrégat de formes végétatives au niveau de l'arbre pulmonaire sur une seule coupe de tissu et ne remarque aucune lésion pulmonaire.

Figure 10 : Système expérimental d'infection par inhalation chez le lapin (d'après (Buechner, 1888))

Physiopathologie chez le cobaye : Les cobayes sont particulièrement sensibles à une infection par inhalation avec des spores virulentes de *B. anthracis* exprimant la capsule et les toxines. En 1957, Ross étudie une cinétique de germination et de prolifération des spores après infection par voie i.t. dans un modèle cobaye avec des spores virulentes (Ross, 1957).

Une coloration au « carbol fuchsine » chaud lui permet de discerner les spores dormantes (colorées en rouge) des spores en phase de germination et des formes végétatives (toutes deux colorées en bleu). Il démontre ainsi l'importance des phagocytes pulmonaires dans l'élimination des spores au niveau des alvéoles. Les spores sont phagocytées en une heure et transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques via les vaisseaux lymphatiques où elles sont retrouvées dès 4 heures. Il note que l'infection résulte de la prolifération extracellulaire des formes végétatives dans les ganglions lymphatiques. Après 24 heures, il observe une prolifération des bacilles dans le sang. De la même façon que Buechner et Barnes, il n'observe aucun recrutement de PNN ni de lésions au niveau du tissu pulmonaire.

C'est seulement quelques heures avant la mort de l'animal que des bacilles sont retrouvés dans les poumons, conséquence d'une infection secondaire faisant suite à l'infection systémique et à la propagation des bactéries dans la circulation sanguine.

Physiopathologie chez la souris : en 1986, Welkos *et al.*, observent, pour différentes souches de souris, une différence de sensibilité à l'infection sous-cutanée avec des spores de *B. anthracis* de souches virulentes ou atténuées (Welkos *et al.*, 1986). Ces différences de sensibilités sont retrouvées après une infection par inhalation avec des spores de *B. anthracis* de souches virulentes (Lyons *et al.*, 2004).

Mais les premières données anatomopathologiques datent de 1947 où Barnes observe, comme Ross chez le cobaye, que les animaux de laboratoire (lapin, cobaye et souris) infectés par des spores virulentes cap/tox de *B. anthracis* par aérosol ne présentent de symptômes pulmonaires que quelques heures avant leur mort (Barnes, 1947). Il remarque que la quantité de spores présente dans les poumons diminue rapidement dans les 24 heures qui suivent l'infection (Barnes, 1947). Il ne détecte aucune forme végétative de la bactérie au niveau des poumons et le nombre de spores retrouvées dans les ganglions lymphatiques 24 heures après infection est faible et très variable entre individu. Il suggère que les spores sont détruites au sein même des poumons, ou bien qu'elles quittent les poumons par une autre voie que la circulation lymphatique. Une hypothèse est qu'elles

atteignent les ganglions lymphatiques et sont rapidement détruites, ou encore qu'elles passent rapidement dans la circulation sanguine depuis les ganglions (Barnes, 1947). Il parvient toutefois à démontrer que les poumons ne constituent pas un site de germination et de prolifération pour les spores de *B. anthracis*, à l'inverse des ganglions lymphatiques qui constituent un site privilégié de germination et de prolifération des spores. Ces études sont les premières à démontrer une implication directe du système lymphatique dans la propagation du pathogène, sans lésions apparentes des poumons.

Lyons *et al.*, observent des spores dans les ganglions lymphatiques drainant dès 5 heures après infection par voie i.t. avec une souche virulente (Lyons *et al.*, 2004). La dissémination du pathogène est caractérisée par l'observation de bacilles dans la rate à 48 heures. Des lésions vasculaires au niveau des poumons sont observées 48 heures après infection, avec présence de bacilles dans l'interstitium pulmonaire mais absence d'inflammation apparente du parenchyme pulmonaire. Un lien étroit est établi entre la présence de bacilles dans l'interstitium pulmonaire et dans la rate, démontrant que la présence de bacilles au sein des poumons résulte d'une infection secondaire faisant suite à l'infection systémique et à la prolifération du pathogène. Une nécrose sévère et une hémorragie sont ensuite détectées au niveau de la rate. La mort survient 2 à 3 jours après infection (Lyons *et al.*, 2004).

Plusieurs travaux ont montré le rôle important de la capsule dans la dissémination de *B. anthracis* chez la souris (Lyons *et al.*, 2004 ; Drysdale *et al.*, 2005 ; Heninger *et al.*, 2006).

Ainsi, une délétion du plasmide pXO2, portant les gènes codant pour la synthèse de la capsule, diminue considérablement les capacités de dissémination du pathogène après infection par inhalation (Drysdale *et al.*, 2005). Plusieurs travaux, utilisant la forme capsulée, décrivent des formes végétatives dans la rate dès 24-48 heures après infection à la fois avec des souches produisant la capsule et sécrétant les toxines (Lyons *et al.*, 2004 ; Drysdale *et al.*, 2005) et avec des souches capsulées et atoxinogènes (Heninger *et al.*, 2006) tandis qu'aucune dissémination n'est observée avec une souche acapsulée (Drysdale *et al.*, 2005).

Ces résultats confirment que la capsule est nécessaire à la dissémination de *B. anthracis* et que les poumons ne constituent pas le site de germination et de prolifération du pathogène.

4.3.2. Données anatomopathologiques chez les primates non humains

Les études portent principalement sur des observations *post-mortem* (entre 2 et 10 jours après infection) et les données observées aux temps précoces restent rares (Lincoln *et al.*, 1965).

Des études ont montré que des chimpanzés exposés à un aérosol d'environ 50 000 spores d'une souche virulente présentent des symptômes caractéristiques seulement quelques heures avant leur mort (Albrink et Goodlow, 1959 ; Vasconcelos *et al.*, 2003).

Plusieurs études sur des modèles de primates non-humains infectés par aérosols confirment que les spores sont phagocytées par les cellules alvéolaires et transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques dans les 18 heures qui suivent l'infection (Henderson *et al.*, 1956 ; Albrink et Goodlow, 1959 ; Lincoln *et al.*, 1965). La germination des spores a lieu dans les ganglions lymphatiques et non dans les poumons (Henderson *et al.*, 1956). Des bacilles sont observés dans les ganglions lymphatiques environ 12 heures avant leur détection dans le sang (Lincoln *et al.*, 1965). La septicémie s'établit 8 heures après l'observation des premiers bacilles dans le sang (Lincoln *et al.*, 1965). Les différentes études montrent que les lésions observées après infection sont similaires entre les différentes espèces de primates nonhumains telles que les singes rhésus (Fritz *et al.*, 1995) et cynomolgus (Vasconcelos *et al.*, 2003) et avec celles observées chez l'homme (Abramova *et al.*, 1993).

4.3.3. Données anatomopathologiques chez l'homme

Tous ces modèles animaux présentent de fortes similitudes avec les données anatomopathologiques observées chez l'homme.

Les analyses des rares cas humains de charbon d'inhalation naturels (Albrink et Goodlow, 1959 ; Albrink *et al.*, 1960 ; Brachman, 1961) ou provoqués (accident de Sverdlosk, 1979 ; attaques à l'automne 2001 aux Etats-Unis) rapportent que les phagocytes chargés de spores s'accumulent au niveau des ganglions lymphatiques, site où les spores germent et où les bacilles prolifèrent (Grinberg *et al.*, 2001 ; Jernigan *et al.*, 2001).

Chez les patients ayant développé un charbon pulmonaire, les études *post-mortem* montrent que

les ganglions lymphatiques médiastinaux sont hémorragiques et nécrosés (Abramova *et al.*, 1993 ; Grinberg *et al.*, 2001 ; Jernigan *et al.*, 2001).

Un rapport montre que les lésions observées au niveau des ganglions sont plus étendues que les autres sites d'infection (Grinberg *et al.*, 2001). Les bactéries se propagent ensuite dans la circulation sanguine avec pour conséquence une septicémie et une toxémie. Des lésions au niveau intestinal sont aussi notées mais proviennent d'une dissémination du pathogène *via* la circulation sanguine étant donné que les ganglions lymphatiques mésentériques ne présentent pas de lésions apparentes (Abramova *et al.*, 1993).

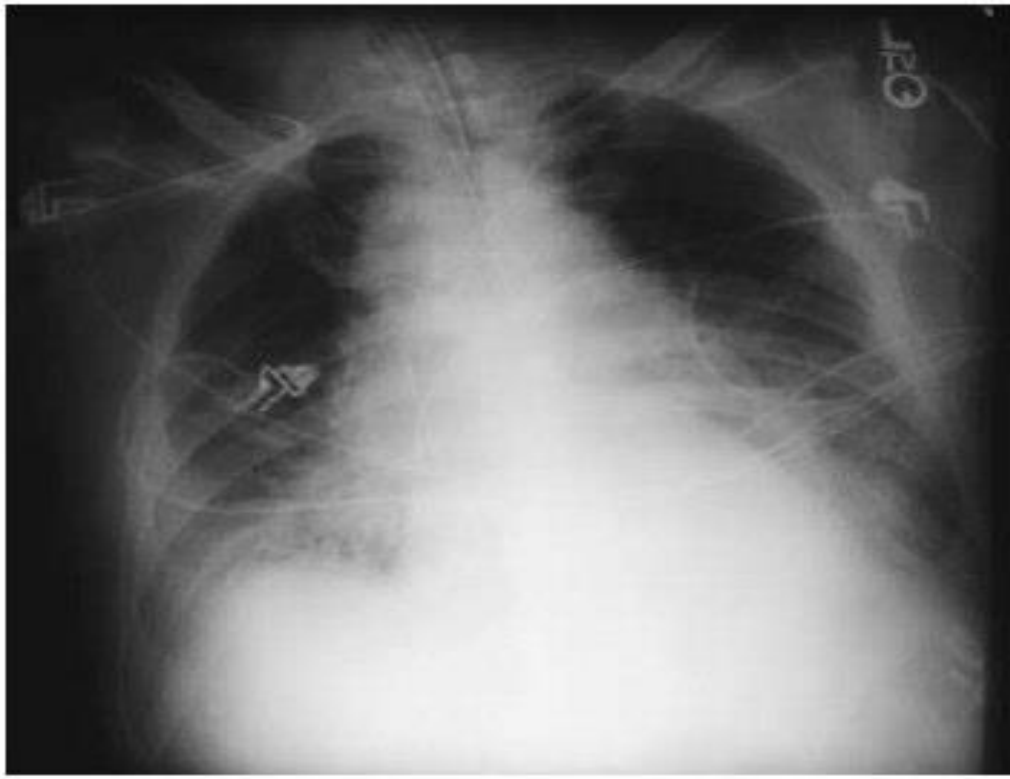


Figure 11 : Radiographie thoracique antéro-postérieure d'un patient ayant développé la forme pulmonaire de la maladie du charbon suite aux attaques bioterroristes de 2001.

L'élargissement médiastinal caractéristique de la forme pulmonaire est clairement visible ainsi qu'un épanchement pleural (d'après Buch *et al.*, 2001)

Les attaques bioterroristes de l'automne 2001 aux États-Unis ont fait ressurgir la gravité d'une infection par voie respiratoire et les méconnaissances des mécanismes immunitaires impliqués. Plusieurs cas ont été précisément décrits (Borio *et al.*, 2001 ; Jernigan *et al.*, 2001 ; Mayer *et al.*, 2001 ; Barakat *et al.*, 2002) et ont permis de mieux connaître les symptômes conduisant au diagnostic clinique du charbon pulmonaire : toux et vomissements associés à un élargissement médiastinal observé par radiographie et sur un scanner thoracique (Figure 9) (Bush *et al.*, 2001 ; Kyriacou *et al.*, 2004). Ces symptômes reflètent la migration massive de phagocytes pulmonaires jusqu'aux ganglions lymphatiques médiastinaux conduisant à une hypertrophie des ganglions hilaires associée à des épanchements pleuraux (Guarner *et al.*, 2003).

4.3.4. Modèle actuel du charbon d'inhalation

Trois étapes majeures peuvent être décrites durant une infection par inhalation : (i) une phase invasive au sein des poumons durant laquelle les toxines ont des effets à courte distance sur la phagocytes pulmonaires principalement ; (ii) une phase de prolifération des bacilles dans les ganglions lymphatiques avec un effet local des toxines ; et enfin, (iii) une phase terminale de diffusion caractérisée par un taux élevé de bactéries dans le sang et des effets à longue distance des toxines conduisant à la mort de l'hôte (voir annexe I), (Tounier *et al.*, 2007). Cependant, peu de données concernant ces différentes étapes sont actuellement disponibles après infection par inhalation chez l'homme et chez l'animal.

4.3.5. Charbon d'inhalation : phases précoces de l'infection

Lors d'une infection par inhalation, les spores pénètrent jusqu'aux alvéoles et les mécanismes mis en jeu pour le passage de ces spores, immobiles, à travers la barrière épithéliale alvéolaire restent inconnus et les cellules impliquées ne sont pas encore bien identifiées. De plus, les études *in vivo* chez la souris montrent que de nombreux bacilles sont retrouvés au niveau des ganglions lymphatiques 5 heures après infection tandis que seules des spores sont retrouvées au niveau du poumon jusqu'à deux jours après infection (Lyons *et al.*, 2004). La germination des spores au niveau des poumons reste très limitée et aucun bacille n'est observé avant la pathologie systémique liée à la dissémination du pathogène (Lyons *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que les spores sont rapidement transportées depuis les alvéoles jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants mais les cellules participant au transport des spores ne sont pas caractérisées.

Les principaux travaux *in vitro* sur les interactions phagocytes pulmonaires-*B anthracis* portent sur l'implication des MA (Guidi-Rontani *et al.*, 1999 ; Cote *et al.*, 2004), population majoritaire des LBA et donc de l'espace alvéolaire (Vermaelen et Pauwels, 2004). Une autre étude a montré que les spores de *B. anthracis* germent dans les phagolysosome des MA (Guidi-Rontani *et al.*, 1999).

Les MA ont alors été proposés pour jouer le rôle de « cheval de Troie » lors de l'infection (Guidi-Rontani, 2002).

Une étude plus récente a montré que la déplétion des macrophages pulmonaires par du clodronate induit une persistance des spores au niveau des alvéoles (forte concentration dans les LBA) et une germination des spores au niveau du tissu pulmonaire 48 heures après infection (Cote *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que les MA pourraient donc jouer un rôle dans l'inhibition de la germination des spores au sein même des poumons. A l'inverse, une déplétion des PNN n'induit aucune modification dans l'élimination des spores ni leur germination au niveau du tissu pulmonaire (Cote *et al.*, 2006). Les PNN semblent donc jouer un rôle secondaire dans la dissémination du pathogène et l'élimination des spores.

Les DCpulm constituent une autre population d'intérêt pouvant jouer un rôle important dans les phases précoces de l'infection par leur capacité de migration jusqu'aux ganglions lymphatiques, caractéristique absente chez les MA. Les DCpulm ont une forte capacité de migration vers les ganglions lymphatiques thoraciques comparativement aux MA (Jakubzick *et al.*, 2006) et leur capacité de migration est augmentée au cours d'une infection bactérienne pulmonaire (Jahnsen *et al.*, 2006). Cela pourrait se traduire *in vivo* par une augmentation de la migration des DCpulm vers les ganglions lymphatiques thoraciques après phagocytose de spores de *B. anthracis*.

Le rôle de ces deux types cellulaires dans le transport des spores jusqu'aux ganglions lymphatiques n'a encore jamais été démontré *in vivo*.

4.3.6. Inhibition de la réponse immune adaptative et diffusion du pathogène

Lors de la migration des phagocytes pulmonaires infectés vers les ganglions lymphatiques, un certain nombre de spores peuvent germer dans le phagosome, comme cela a pu être montré *in vitro* sur des MA murins (Guidi-Rontani *et al.*, 1999) et c'est à partir des ganglions lymphatiques que le

pathogène se propage dans tout l'organisme. Aucune donnée, *in vivo* ou *ex vivo*, concernant la germination des spores au sein des DCpulm n'est disponible.

Le rôle de l'immunité adaptative dans le charbon d'inhalation est controversé du fait de la rapidité de l'infection (Starnbach et Collier, 2003). Les patients ayant développé un charbon pulmonaire après les attaques bioterroristes de 2001 ne présentaient pas d'Ac anti-PA détectable dans les premiers prélèvements sanguins et n'ont donc pas développé de réponse spécifique (Quinn *et al.*, 2004). Toutefois, une étude récente démontre, par l'analyse de tests cellulaires, que l'exposition à des spores induit une réponse immune dose-dépendante chez les patients (Doolan *et al.*, 2007).

Les toxines sécrétées pourraient jouer un rôle à ce niveau de l'infection, les ganglions lymphatiques thoraciques étant le site de présentation de l'antigène aux cellules T naïves par les DC. Ainsi, le lien entre l'immunité innée et la réponse immune adaptative n'aurait plus lieu si la fonction CPA des DC était inhibée. Toutefois, les données *in vivo* ou *ex vivo* sur les effets des toxines sur la fonction CPA des DCpulm sont absentes.

La phase terminale du charbon d'inhalation est corrélée aux effets des toxines après diffusion du pathogène dans la circulation sanguine. C'est durant cette phase, qui précède la mort de l'hôte, que de nombreux bacilles sont observés dans le sang ainsi que dans la rate et les poumons chez la souris (Tableau VIII) (Lyons *et al.*, 2004 ; Drysdale *et al.*, 2005). Les formes végétatives produisent de grandes quantités de toxines dont les effets ont été largement étudiés après injection i.v. dans plusieurs modèles *in vivo*. Toutefois les études physiopathologiques après infection par inhalation avec une souche virulente sont rares et souvent anciennes.

Lorsque la phase tardive, correspondant à une toxémie sévère, est atteinte, aucun traitement antibiotique n'est efficace car il ne permet pas la neutralisation des toxines. C'est pourquoi une meilleure compréhension des phases précoces de la maladie semble nécessaire afin de développer des stratégies thérapeutiques mieux adaptées dans le cadre d'une infection pulmonaire par des spores de *B. anthracis*.

4.4. Formes cliniques

Chez l'animal : le charbon frappe surtout les mammifères herbivores et certains oiseaux occasionnant une infection septicémique rapidement mortelle avec œdème hémorragique des muqueuses et exsudation du sang noir par les orifices naturels.

Chez l'homme : la forme cutanée, la plus fréquente, se manifeste par une lésion siégeant au point de pénétration du bacille constituée d'une pustule noirâtre entourée de petites vésicules et rapidement transformée en escarre nécrotique. L'infection évolue le plus souvent sans fièvre, ni douleur, ni altération de l'état général et guérit spontanément en peu de temps. Il existe cependant des formes graves avec œdème malin.

Bacillus anthracis est l'espèce la plus pathogène parmi le genre *Bacillus* et peut atteindre les animaux (ovins et caprins, bovins), certains oiseaux (autruches, canards), des insectes et exceptionnellement l'homme

Le pouvoir pathogène du bacille charbonneux repose sur sa virulence et sur sa toxicité. La virulence ou la capacité à proliférer dans l'organisme hôte, repose sur l'existence d'une capsule de nature polypeptidique. La capsule est antigénique, provoquant l'apparition d'anticorps ne protégeant pas les bovins.

La toxicité est conférée par une toxine qui entraîne la formation d'anticorps neutralisants jouant un rôle important dans l'immunité anticharbonneuse. Cette toxine est de nature protéinique et composée de trois facteurs I, II et III, qui pris séparément sont atoxiques.

Le facteur I est encore appelé le facteur oedématogène, car mélangé au facteur III, il produit des oedèmes chez le lapin.

Le facteur II est le facteur immunogène. Le facteur III ou facteur létal, injecté avec le facteur II, entraîne la mort du lapin (Stanley et Schimit, 1961).

Le pouvoir toxique de *Bacillus anthracis* la fait utiliser comme arme biologique stratégique à des fins militaires depuis la seconde guerre mondiale (un gramme de spores de *Bacillus anthracis* peut

tuer 10 millions de personnes correspondant à une dose létale cinquante (DL 50) d'environ 8000 spores par voie buccale) (Ivins *et al.*, 1998).

Trois formes cliniques de la maladie du charbon sont décrites chez l'homme et chez les animaux. Elles sont regroupées en deux catégories : le charbon externe où les spores sont inoculées à travers la peau et produisant la forme cutanée de la maladie et les charbons internes qui correspondent à une entrée de spores par inhalation ou par ingestion, donnant respectivement les formes pulmonaire et gastro- intestinale.

Les trois formes sont potentiellement fatales mais les formes internes présentent un risque mortel beaucoup plus élevé.

4.4.1. Forme cutanée

La forme cutanée représente 95% des cas de charbon et correspond à une infection par le biais d'une plaie ou d'une piqûre d'insecte (Dixon *et al.*, 1999). La période d'incubation est de 1 à 5 jours.

La première phase correspond à la formation d'une papule qui, après 1 à 2 jours, se transforme en une vésicule érythémateuse. Cette vésicule se rompt pour former un ulcère nécrotique qui devient noirâtre et forme alors l'escarre noire caractéristique de la forme cutanée de la maladie du charbon (Figure 12) (Kaufmann et Dannenberg, 2002).



Figure 12 : Forme cutanée de la maladie du charbon avec les escarres noires caractéristiques. Cas après exposition naturelle, Turquie (Kolbe *et al.*, 2006).

4.4.2. Forme gastro-intestinale

Appelée aussi « oropharyngée », cette forme correspond à une infection par ingestion de spores. La période d'incubation varie de 2 à 5 jours et les premiers symptômes sont souvent non spécifiques à savoir nausées, vomissements, fièvre et douleurs abdominales sévères. Des lésions intestinales avec des diarrhées se développent, les ganglions deviennent hémorragiques, une ascite peut se former et des escarres caractéristiques sont retrouvées au niveau de la paroi intestinale.



Figure 13 : Forme gastro-intestinale de la maladie du charbon. Cas après ingestion de viande de mouton contaminée, Liban. **A**, Dilatation cœcale au lavement baryté ; la photo en haut à droite montre des bacilles Gram +, immobiles et formant des spores (flèches) après mise en culture des ganglions mésentériques ; **B**, aspect per opératoire du cæcum (Ghossain, 2006).

Moins fulgurante que la forme respiratoire, elle est cependant fatale dans 95% des cas chez les herbivores et dans plus de 50% des cas chez l'homme, la mort pouvant se produire dans les jours voire les heures suivant les premiers symptômes (Sirisanthana et Brown, 2002).

4.4.3. Forme pulmonaire

Le charbon pulmonaire correspond à une infection après inhalation des spores de *B. anthracis*. L'homme et les herbivores sont particulièrement sensibles à ce type d'infection.

Si les cas humains étaient relativement fréquents au XIX^{ème} siècle et au début du XX^{ème} siècle, touchant principalement les cardeurs de laine et les tanneurs, la forme pulmonaire est aujourd'hui associée à des cas sporadiques, les épidémies étaient rarement dues à une exposition naturelle.

En 1979, un accident dans une base militaire russe provoque la libération d'une grande quantité de spores de *B.anthraxis* par aérosol, provoquant la mort de 68 personnes sur 96 cas, initialement déclarés comme des cas digestifs (Abramova *et al.*, 1993 ; Meselson *et al.*, 1994). Durant l'automne 2001 aux Etats unis, l'envoi de lettres contaminées avec des spores de charbon a provoqué la mort de 5 patients ayant développé un charbon pulmonaire (sur 11 cas pulmonaires au total dont 8 diagnostics précoces) (Figure 14) (Barlett *et al.*, 2002 ; Inglesby *et al.*, 2002). Le charbon pulmonaire est la forme clinique la plus fatale et la plus fulgurante (Borio *et al.*, 2001).

Les spores mesurant 1µm, atteignent les bronchioles et les alvéoles du système respiratoire. La période d'incubation est d'environ 6 jours mais peut atteindre 60 jours (Meselson *et al.*, 1994). Une première phase de manifestation clinique peut durer quelques jours avec des symptômes non spécifiques incluant des sensations de malaise, une toux non productive, de la fièvre, des douleurs rétro-sternales et des myalgies.

En l'absence de traitement, une deuxième phase fulgurante liée à l'installation d'un état septicémique et toxémique se met en place avec détresse respiratoire, hypoxie, cyanose, hypothermie, état de choc, épanchement pulmonaire caractéristique et, en moins de 24 heures une méningite charbonneuse se déclare, plongeant le patient dans le coma.

Les ovins peuvent mourir en quelques minutes avec pour seuls symptômes un déficit respiratoire et éventuellement un saignement au niveau des orifices corporels. Les autres espèces meurent 24 à 48 heures après l'apparition des symptômes cliniques (Shafazand *et al.*, 1999).

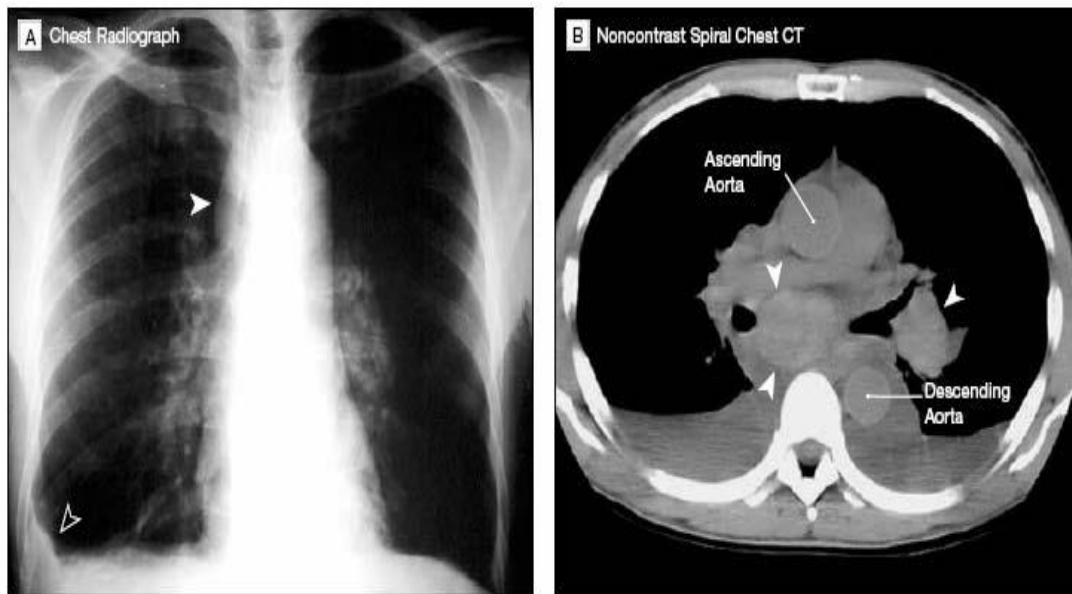


Figure 14 : Forme pulmonaire de la maladie du charbon. Cas après exposition bioterroriste, États-Unis, 2001. **A**, radio thoracique, la flèche pleine indique l'élargissement du médiastinum, la flèche noire montre un épanchement pleural ; **B**, tomодensitométrie sans injection de produit de contraste. Les flèches pleines indiquent des ganglions hypertrophiés, on remarque aussi les épanchements pleuraux bilatéraux (Mayer *et al.*, 2001).

4.4.4. Anthrax injectable :

Récemment, un nouveau type d'infection par l'anthrax a été identifiée chez les utilisateurs de drogues injectables héroïne en Europe du Nord. Ce type d'infection n'a jamais été signalé aux États-Unis.

Les symptômes peuvent être similaires à ceux de l'anthrax cutané, mais il peut y avoir une infection profonde sous la peau ou dans le muscle où le médicament a été injecté. L'anthrax injectable peut se propager dans tout le corps plus rapidement et être plus difficile à reconnaître et à traiter. Beaucoup d'autres bactéries les plus courantes peuvent causer des infections de la peau et du site d'injection ou un utilisateur de drogue ne signifie pas nécessairement que la personne a l'anthrax.

L'anthrax par injection est une maladie rare qui affecte les utilisateurs d'héroïne et est causée par *Bacillus anthracis*.

En 2012, il y avait quatre cas en Allemagne, dont un mortel, ainsi qu'un petit nombre de cas dans d'autres pays européens, dont le Danemark, la France et le Royaume-Uni. Trois autres cas ont pu être observés chez les usagers de drogues en Allemagne en 2009/2010, dans le cadre d'une épidémie de grande ampleur centrée sur l'Ecosse, où il y avait 119 cas.

Présentation d'un cas et l'évolution clinique

L'anthrax injectable peut être considérée soit comme une entité indépendante de la maladie ou comme un type particulier de charbon cutané avec œdème massif, fascite nécrosante dans de nombreux cas, et la mortalité d'environ 30%.

Il est apparu au cours des dernières années chez les héroïnomanes dans divers pays européens. Chez les patients avec la présentation clinique est évocatrice de l'utilisation de l'héroïne. L'infection charbonneuse doit être suspectée tôt, alors que les tests de diagnostic appropriés peuvent être réalisés dans les délais. Il est donc important que les médecins et les personnes à risque soient bien informés sur cette maladie.

Les infections cutanées telles que les abcès, érysipèle, et phlegmon sont les complications les plus fréquentes de l'abus de drogues par voie intraveineuse. Les sources de contaminations sont habituellement la flore normale du corps (Fink B, *et.al.*, 2011). L'anthrax injectable, est probablement causée par l'héroïne contaminée par *Clostridium botulinum* voire *Bacillus cereus*. Depuis 2012, et jusqu'à l'heure actuelle, il ya eu quatre cas de charbon injectable en Allemagne, dont l'un était fatale. D'autres cas doivent être attendus. Il avait déjà eu trois cas de ce type de charbon associé à la consommation de drogues en Allemagne en 2009/2010. Ce foyer avait été centrée sur l'Ecosse, où il y avait 119 cas (Health Protection Scotland. 2011).

Environ 95% des infections chez les humains sont cutanées (Doganay M, *et.al.*, 2010). La transmission d'homme à homme est extrêmement rare. L'héroïne contaminée est la source la plus probable de la maladie du charbon injectable, mais le mode de cette contamination demeure encore inconnu.

L'anthrax cutané est essentiellement dû à la transformation des produits d'origine animale provenant d'animaux infectés (Duric P, *et al.*, 2012)

Le taux de mortalité de l'anthrax intestinale et pulmonaire, lorsque la maladie est traitée est d'environ 50% . (Inglesby TV, *et.al.*, 2002). Pour l'anthrax cutané, le chiffre est d'environ 5% (Doganay *et.al.*, 2010) et pour l'anthrax injectable actuellement autour de 30% (Grunow R, *et.al.*,2012). L'initiation précoce du traitement antibiotique est le facteur le plus important dans le pronostic. Les périodes d'incubation allant de quelques heures à plusieurs jours ou même parfois plus longues ; (Meselson M, *et.al.*, 1979).

Etude d'un cas:

Un utilisateur d'héroïne admis en urgence dans un hôpital à Ratisbonne en Juin 2012 qui avait consommé diverses substances le jour de l'admission. Le patient se plaint de l'enflure et une rougeur au site d'injection sur son / son bras gauche qui avait augmenté de taille au cours des deux derniers jours, ainsi que des nausées et des essoufflements.

Elle avait été traitée la thérapie par voie orale pendant deux ans; elle avait l'habitude de prendre journalièrement une dose d'héroïne, de la cocaïne et abusait de l'alcool pendant de nombreuses années et a été également connu comme souffrant de l'hépatite C et la cirrhose du foie.

Le diagnostic initial avait indiqué une intoxication médicamenteuse, sans fièvre avec une santé en général significativement compromise. En quelques heures, la patiente a été transférée à l'unité de soins intensifs suite à de l'augmentation de son insuffisance respiratoire.

Les tests de laboratoire ont montré une modification importante des paramètres hématologiques dont l'hyperleucocytose, l'anémie, la thrombocytopénie, l'augmentation de la procalcitonine, l'hypokaliémie, et une valeur extrêmement élevée de D-dimères. L'état de la patiente se détériora rapidement et il / elle est décédée le jour de l'admission d'un choc septique avec défaillance multiviscérale et hémorragie massivement diffusé. *B. anthracis* avait été suspecté et identifié par des tests de laboratoire (Laboratoire de microbiologie, Hôpital universitaire de Regensburg), puis confirmé Le lendemain par PCR spécifique, dans un laboratoire de référence (microbiologie Institut des Forces armées allemandes à Munich) (. Holzmann T *et.al.*, 2012. E).



Figure 15 : Etude d'un cas d'anthrax injectable

V. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

Le diagnostic expérimental peut faire appel à diverses techniques.

5.1. Prélèvements

Ils diffèrent selon qu'il s'agit d'un cas animal ou humain de charbon. Pour l'animal, on dispose le plus souvent de fragments d'organes ou d'un os long prélevé au cours d'une autopsie. On peut également s'adresser à différents produits d'origine animale soupçonnés d'être à l'origine de contaminations humaines ou animales, comme des os broyés, un aliment composé, des peaux, etc.... Chez l'homme, le prélèvement peut être réalisé sur la lésion ou consister en du sang en vue d'isoler l'agent pathogène, ou ultérieurement de chercher des anticorps.

5.2. Diagnostic bactériologique

Il peut être réalisé sur des frottis de sang ou d'organes provenant de cadavres : il peut fournir une orientation en cas de constatation de bacilles volumineux, groupés en petites chaînes. Cependant, les risques d'erreurs par excès ou par défaut sont nombreux.

- **La culture** : Elle peut être réalisée sur milieux usuels lorsque le prélèvement est vraisemblablement monomicrobien (hémoculture, cadavre frais). En revanche, on doit recourir à des milieux sélectifs chaque fois que l'on s'adresse à un prélèvement polymicrobien (aliments composés par exemple).
- **Milieux de culture** : Parmi les milieux non sélectifs, on peut utiliser le milieu de Pearce et Powell, composé de gélose nutritive contenant 40 µg d'hématine et 60 µg de lysozyme par ml, incubée à 40°C, ou le milieu de Knisely qui est une gélose à l'extrait de cœur contenant 300 UI/ml de polymyxine, 40 µg de lysozyme par ml, 300 µg/ml d'éthylène diamine tétracétate et, 40µg/ml d'acétate de Thallium. Si le prélèvement polymicrobien contient des spores de *Bacillus anthracis*, on peut supprimer la flore non sporulée en le soumettant à un chauffage à 80°C pendant 5 minutes avant l'ensemencement. Une antibiothérapie précoce peut entraîner un échec lors de l'essai d'isolement de *Bacillus anthracis* à partir d'un organisme infecté.
- **Isolement de *Bacillus anthracis*** par les méthodes dites classiques à partir de prélèvements cliniques (hémocultures, écouvillon cutané, LCR, dans l'oropharynx,)
- **L'isolement d'une souche de *Bacillus anthracis*** à partir d'un prélèvement nécessite une technique d'identification précise. Le principal problème qui peut se poser est celui de la distinction entre *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* constitué par de gros bacilles morphologiquement proches.
- **Résultats de la culture** : Les caractères différentiels entre ces deux espèces de *Bacillus* sont résumés dans le tableau n°1 suivant (L, Leminor et Veron, 1989, Bactériologie Médicale, 2nd édition) :

- **Diagnostic différentiel** des deux espèces très voisines de *Bacillus* voir tableau I

Tableau I : Diagnostic différentiel de *Bacillus anthracis*

Caractères	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Mobilité	Négatif	Positif
Capsule (in vivo)	Positif	Négatif
Colonies Gélose au sérum	S	R
Gélatine	Hydrolyse lente	Hydrolyse rapide
Lait tournesolé	Coagulation lente	Coagulation rapide
Lécithinase	Variable	Positif
Hémolyse	Variable	Positif
Salicine	Variable	Rapidement
Pénicilline	Sensible	Résistant
Sensibilité aux phages	A et AC	AC et C
Dose létale pour le cobaye	Suffisant à faible dose	Nécessite une forte dose

- Dans des prélèvements pulmonaires.

- Dans la forme cutanée, le bacille est présent en grande quantité au niveau des lésions cutanées de charbon, mis en évidence par coloration de Gram, par des tests d'immunofluorescence directe et par culture et confirmation du diagnostic possible par PCR.

- **Antibiogramme** : *Bacillus anthracis* est habituellement sensible aux pénicillines, à la doxycycline, aux fluoroquinolones. Bien que rare, la résistance à la pénicilline est trouvée dans 3 à 12 % des souches. La pénicilline ne doit donc être utilisée qu'en deuxième intention en fonction du résultat de l'antibiogramme. Les antibiotiques sont efficaces sur les formes

germinatives ou végétatives du *B. anthracis*, mais non sur les spores. *B. anthracis* est sensible à de nombreux antibiotiques, la pénicilline fut longtemps l'antibiotique de choix pour le traitement de la maladie. Des souches résistantes ayant été décrites, les fluoroquinolones (Ciprofloxacine, ofloxacine ou Lévofloxacine) ou une tétracycline (la doxycycline) sont maintenant recommandées. La mise en application des protocoles de traitement doit se faire le plus rapidement possible, même en l'absence de signes cliniques et doit concerner toute la population exposée.

5.3. Diagnostic moléculaire

Une méthode rapide et sensible pour détecter *B. anthracis* a été mise au point afin d'assurer une bonne gestion et un contrôle des cas d'animaux à risque de maladie du charbon pour aborder les questions de santé publique.

Cependant, il est devenu récemment difficile d'identifier *B. anthracis* en utilisant des méthodes moléculaires signalées précédemment, en raison de l'émergence de *B. cereus*, qui peut provoquer une grave infection extra-intestinale, de même que *B. thuringiensis* lesquels sont génétiquement liés à *B. anthracis*.

La relation génétique proche de ces espèces, a mené à la complexité du diagnostic moléculaire basée sur la PCR. Afin d'améliorer la qualité du diagnostic, une nouvelle technique PCR a été établie à savoir, la PCR multiplex pour l'identification de *B. anthracis* à partir des gènes de plasmides de virulence qui va permettre de différencier *B. anthracis* des autres souches génétiquement liés provenant d'espèces du groupe *B. cereus* (Nick M *et al*, 2014)

Six amorces ciblant l'ensemble des chromosomes des plasmides de *B. anthracis*, deux plasmides, pXO1 (gènes toxiques) et pXO2 (gènes de virulence), un gène bactérien, le gène de l'ARNr 16S et un gène de mammifère, le gène de l'actine- β , ont été conçus. La PCR multiplex a détecté environ 3,0 UFC de *B. anthracis* par réaction de PCR et est ainsi sensible à *B. anthracis*.

Les amorces de contrôle interne sont également utilisées et détectées chez tous les ADN bactériens et de mammifères étudiés, ce qui indique l'applicabilité pratique de ce test car elle permet la surveillance de l'amplification appropriée.

Le test a également été appliqué pour la détection de souches cliniques génétiquement liées à *B. anthracis*, qui étaient les souches de *B. cereus* isolées de flambées d'infections à l'hôpital au Japon, et des souches isolées sur le terrain en Zambie. Le test différencié *B. anthracis* a indiqué son lien génétique avec les autres souches du groupe *B. cereus*.

Les résultats des tests réalisés, indiquent que la PCR multiplex nouvellement développée est très sensible et constitue une méthode pratique pour l'identification moléculaire de *Bacillus anthracis* (Ogawa H et al., 2015)

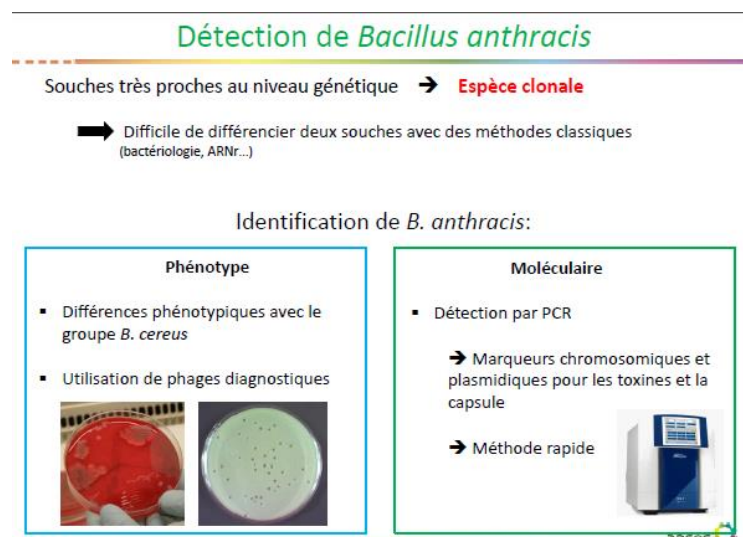


Fig 16 : Schéma résumé des méthodes de diagnostic bactériologique et moléculaire :

5.4 Analyse génomique :

L'étude pangénomique chez l'homme a donné un ratio core pangénome de *B. anthracis* égale à 99% qui est identique à celui retrouvé chez d'autres bactéries pathogènes comme illustré dans le tableau suivant :

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

Espèces	Génome 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

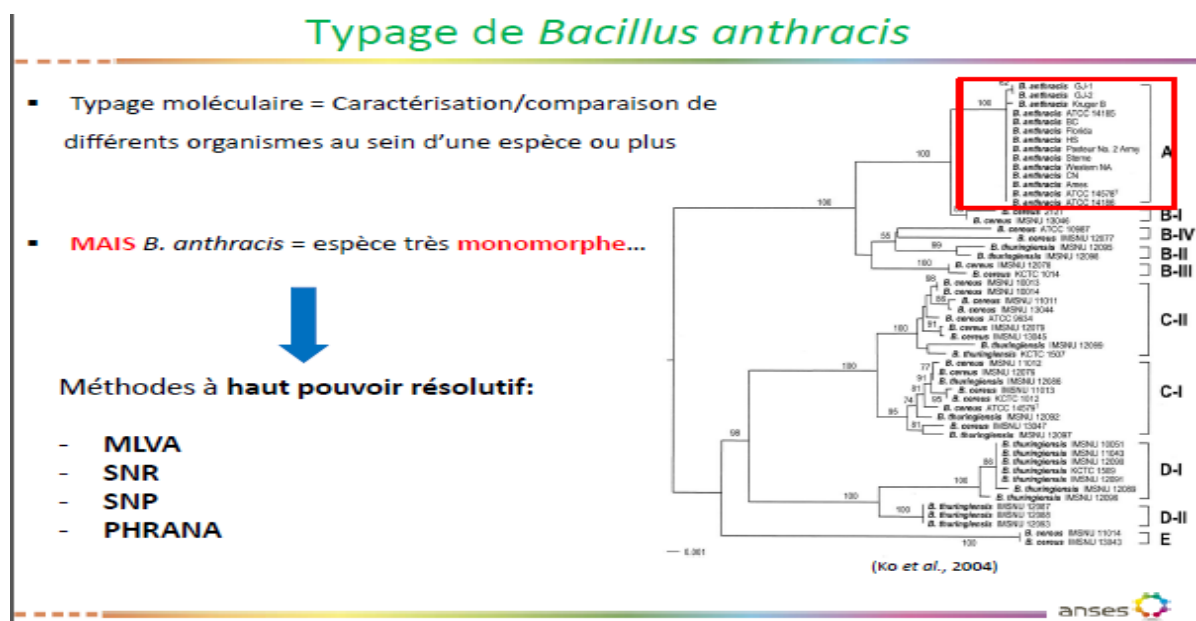
Ce tableau montre que le ratio élevé core/pan - génome des souches de *B. anthracis* (99%) est identique à celui retrouvé chez d'autres bactéries pathogènes.

Typage des souches

Le MLST est une procédure sans ambiguïté basée sur la caractérisation des isolats d'espèces bactériennes en utilisant les séquences de fragments génomiques d'espèces microbiennes (généralement internes). Environ 450-500 pb de chaque gène sont utilisés, ceux-ci peuvent être séquencés avec précision sur les deux brins en utilisant un séquenceur d'ADN automatisé. Chaque isolat d'une espèce se caractérise donc sans ambiguïté par une série de sept nombres entiers qui correspondent aux allèles des sept locus choisis (gènes de ménage. Dans le MLST le nombre de différences de nucléotides entre les allèles est ignoré et les séquences sont données sur différents nombres d'allèles si elles diffèrent sur un site nucléotidique unique ou à plusieurs endroits. La raison en est qu'un seul événement génétique résultant en un nouvel allèle peut se produire par une mutation ponctuelle (modifiant seulement un site nucléotidique simple), ou par un remplacement

de recombinaison (qui sera souvent changé dans plusieurs sites) - pondération en fonction du nombre de différences de nucléotides entre les allèles serait à tort de considérer l'allèle étant plus différent que par le traitement des changements nucléotidiques comme un seul événement génétique. La plupart des espèces bactériennes ont suffisamment de variation dans les gènes de ménage capables de fournir de nombreux allèles par locus, assurant des milliards de profils alléliques distincts d'être identifié en utilisant sept gènes de ménage. Par exemple, une moyenne de 30 allèles par locus permet environ d'identifier 20 milliards de génotypes.

Le MLST est basé sur les principes bien établis de l'électrophorèse enzymatique multilocus, mais diffère en ce qu'elle attribue des allèles à plusieurs gènes de ménage directement par séquençage d'ADN, plutôt qu'indirectement par l'intermédiaire de la mobilité électrophorétique de leurs produits géniques. Le grand avantage de MLST est que les données de séquence sont sans équivoque et les profils alléliques d'isolats peuvent facilement être comparés à ceux dans une grande base de données centrale via Internet (à la différence de la plupart des procédures de typage qui impliquent la comparaison portant sur les tailles de fragments d'ADN sur des gels). Les profils alléliques peuvent également être obtenus à partir de matériel clinique par amplification par PCR des sept gènes de ménage directement à partir de sang ou du LCR. Ainsi les isolats peuvent être caractérisés précisément, même quand ils ne peuvent pas être cultivés. (M.C. Maiden *et al.*, 1998 ; Urwin *et al.*, 2003).



SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)

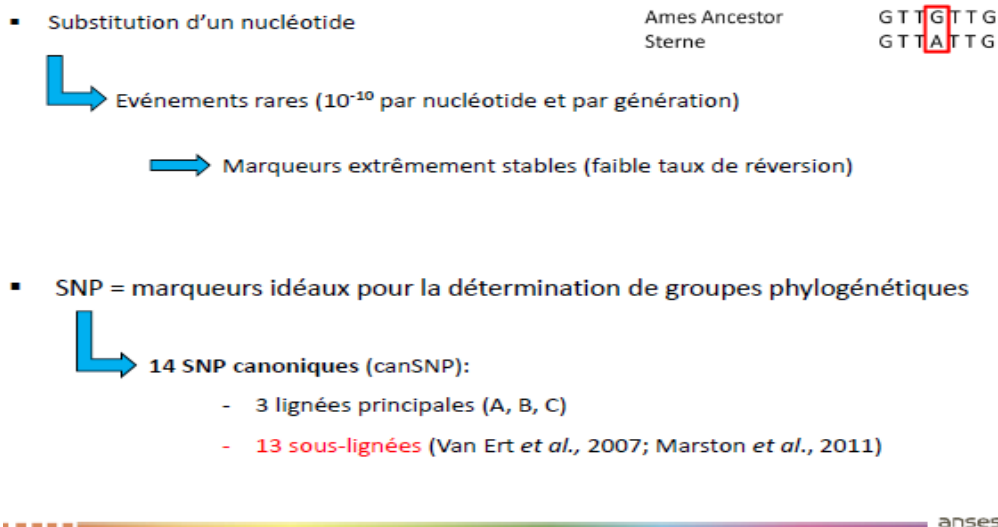


Figure 17 : Typage de *Bacillus anthracis* (MLST)

5.5. Diagnostic sérologique :

La sérologie consistant en la recherche d'anticorps dirigés contre *B.anthraxis* n'a pas un grand intérêt. :

Le diagnostic indirect peut être réalisé en immuno sérologie par l'utilisation de la séroneutralisation, de l'ELISA anticorps et de la réaction d'Ascoli.

Réaction d'Ascoli : Le principe de la réaction consiste à révéler la présence des antigènes polysaccharidiques, somatiques, thermostables de *Bacillus anthracis* dans un prélèvement grâce à un sérum anticharbonneux contenant des anticorps précipitants.

Le prélèvement (fragment d'organes de peau) est broyé au mortier stérile avec 5 à 10 fois son poids physiologique, puis chauffé à 100°C pendant 5 minutes et filtré. Dans un petit tube à précipitation, on dépose du sérum précipitant anticharbonneux, puis en évitant le mélange des deux liquides, le filtrat. Si le prélèvement contient des antigènes de type *B. anthracis*, un mince disque de précipité blanchâtre se forme à l'interface des deux liquides, en quelques instants et il peut être observé sur fond noir avec échange latéral. Cette technique possède l'avantage de fournir des résultats positifs même avec des prélèvements dans lesquels les bacilles ont été lysés.

Il existe toujours en sérologie un second test consistant en la recherche d'anticorps anti *Bacillus anthracis* chez les personnes convalescentes du charbon : dans ce cas on peut recourir à la réaction de fixation du complément, à la précipitation par l'immunoélectrophorèse.

Le Centre National de Référence (CNR) à l'Institut Pasteur de Paris et le laboratoire associé au CNR (Anses Maisons Alfort) réalisent la PCR et l'antibiogramme des souches. voir plus haut.

Le charbon bactérien peut être suspecté au plan clinique lorsqu'on constate la présence d'une entérite hémorragique et des troubles digestifs. Le diagnostic est aussi nécropsique (septicémie hémorragique) avec du sang noir, épais, incoagulable, une rate hypertrophiée de couleur foncée et expérimentalement et directement par isolement et identification du germe à partir de prélèvement de sang ou d'organes contaminés ou indirectement par les tests sérologiques

5.6. Pouvoir pathogène expérimental

Cette étude est importante pour le diagnostic en laboratoire :

Dans les conditions expérimentales, certaines espèces animales se révèlent très sensibles comme le cobaye et la souris, d'autres moins sensibles comme le lapin. Le rat blanc s'avère résistant.

L'animal utilisé le plus souvent pour l'étude du pouvoir pathogène expérimental de *B. anthracis* et pour le diagnostic est le cobaye. Après inoculation par diverses voies, la mort survient en une quarantaine d'heures en moyenne avec des lésions qui sont voisines de celles observées dans les conditions naturelles (caractères du sang, splénomégalie, hématurie) et comprennent aussi un œdème de la zone d'inoculation.

Il est aussi pratiqué l'étude du pouvoir pathogène expérimental (PPE) chez la souris : Elle consiste à procéder à l'inoculation de 500 µl la souche isolée en culture par la voie intra péritonéale et de suivre l'animal pendant 24 Heures : généralement la mort survient 6 Heures après l'inoculation. Après la mort une autopsie est faite de même qu'un frottis par apposition sur la rate hypertrophiée : le frottis est par la suite coloré par la méthode de Giemsa ou par utilisation du colorant RAL555 et observé au microscope avec le grossissement 100 à l'immersion, montrant des bacilles à Gram +.

VI. TRAITEMENT ET PREVENTION

6.1. Bases du traitement de l'Anthrax

Le développement de la maladie après inhalation de spores ne peut être empêché que par un traitement antibiotique prolongé.

Le charbon bactérien peut être efficacement traité s'il est institué rapidement par l'antibiothérapie par voie intrapéritoneale à raison de 1ml par jour ou par usage de la sérothérapie par voie sous cutanée à raison de 1ml et à l'aide de sérums hyperimmuns (Lucchesi, 1941).

Les effets dus à l'activité de la toxine létale peuvent être neutralisés aussi bien in vitro qu'in vivo à l'aide d'anticorps monoclonaux, dirigés contre les épitopes de l'antigène protecteur (Little, 1990)

Les recommandations thérapeutiques du service de santé des Armées sont basées sur les mêmes molécules : l'administration de ciprofloxacine ou de doxycycline en choix de première intention, par voie orale en prophylaxie (500 mg toutes les 12 heures) ou par voie I.V en thérapeutique (400 mg toutes les 12 heures). Après identification de la souche et étude de sa sensibilité, un nouvel antibiotique plus adapté est administré avec un traitement d'une durée totale de 60 jours (SSA, 2004).

Le CDC (center for diseases control and prevention) recommande l'administration de ciprofloxacine per os en prophylaxie. En thérapeutique, l'administration de ciprofloxacine ou de doxycycline associée à un ou deux autres agents antimicrobiens tels que la rifampicine, la vancomycine, la pénicilline ou l'ampicilline par voie I.V est recommandé pour l'adulte.

Pour l'enfant, le traitement est identique mais ramené à des doses appropriées. Le traitement doit être remplacé le plus rapidement possible par un traitement per os (ciprofloxacine). La durée du traitement est des 60 jours (CDC, 2002).

Etant donné les taux élevés de mortalité dues à l'infection, le traitement des femmes enceintes ou des personnes immunodéprimées est généralement le même que pour l'adulte ou l'enfant, respectivement.

L'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) recommande une molécule de la famille des fluoroquinolones ou la doxycycline per os en prophylaxie de première intention chez l'adulte (ciprofloxacine : 1g/jour en deux prises). Seule la ciprofloxacine ou la doxycycline sont recommandées pour l'enfant de moins de 15 ans. En thérapeutique, les mêmes molécules sont recommandées par voie I.V. La durée du traitement est de 8 semaines et un traitement relais est recommandé après isolement de la souche et évaluation de la sensibilité en raison de la persistance potentielle des spores après une exposition par aérosol (AFSSAPS, 2005).

6.2. Prévention de l'anthrax

6.2.1. Principe de la prévention

La prévention contre le charbon bactérien repose sur la vaccination par l'utilisation de vaccins inactivés adjuvés à l'aide de l'hydroxide d'alumine.

Deux types de protection par l'immunisation active ou par la forme passive, sont utilisés.

Chez l'animal : la prévention du charbon repose essentiellement sur la prophylaxie médicale par injection annuelle d'un vaccin constitué de suspension de spores d'une souche atténuée de *Bacillus anthracis*. L'immunité conférée par ce vaccin est excellente.

L'arrêt de la vaccination en région infectée, risque d'être suivie d'une réapparition importante de cas de charbon animal (Pomerantsu, 1995 ; Pomerantsu *et al.*, 1997).

Le succès de la lutte contre le charbon animal repose donc sur une vaccination régulière appliquée aux espèces sensibles en zone polluée, associée à des mesures sanitaires de destruction des cadavres en cas d'apparition de la maladie (Leon Leminor *et al.*, 1989).

6.2.2. Les vaccins

6.2.2.1. Vaccin et vaccination contre le charbon bactérien

Les premiers travaux sur les vaccins, reviennent à Louis Pasteur qui avait découvert en 1881 un processus d'atténuation de la virulence de *Bacillus anthracis* in vitro à 42°5 C, puis fixation de l'atténuation par sporulation à 37°C.

Pasteur obtint ainsi deux types de vaccins :

- Le vaccin Pasteur de type n°1 (le plus atténué)
- et le n°2 (le moins atténué).

Cependant les vaccins ont un pouvoir pathogène résiduel (apparition parfois de charbon vaccinal) et une atténuation plus poussée de ces vaccins Pasteur, s'avérait nécessaire, entrepris par divers auteurs (Besreda, 1925 ; Mazude et Huska, 1930 ; Ramon, Stand ; Delpy, 1931).

La souche vaccinale de Delpy est capsulée, mais non productrice de toxine, donc dépourvue de plasmide PXO1 (Delpy, 1931).

Il existe aujourd'hui un vaccin acellulaire, mis au point dans les années soixante aux Etats-Unis et au Royaume-Uni, recommandé dans certains pays pour les professionnels particulièrement exposés.

Les vaccins de type moderne ont suivi, notamment le vaccin Sterne dont la souche vaccinale est dépourvue de plasmide PXO2 et les vaccins chimiques (vaccins non microbiens, ne contenant que le facteur II, le facteur vaccinant).

Cette souche Sterne porte le plasmide responsable de la toxicité mais pas le plasmide PXO2 et est par conséquent avirulent mais toxique. Il s'agit de l'inverse de la souche Pasteur qui porte le plasmide PXO2 mais pas le PXO1. Cette souche est souvent utilisée pour le développement de vaccins.

Ce dernier type de vaccin relève désormais des techniques de fabrication des « vaccins recombinants ».

6.2.2.2. Généralités sur les vaccins recombinants

- Principe de la fabrication des vaccins recombinants

Il s'agit de vaccins dont la souche vaccinale est construite par génie génétique et reposant sur l'expression dans l'organisme à vacciner d'un gène étranger codant pour un antigène immunogène spécifique.

Ce processus comprend plusieurs étapes :

- Etapes du processus

- Identification de l'antigène immunisant et isolement du gène correspondant

Les meilleurs antigènes sont de nature protéique ; toute protéine est codée par un gène spécifique et un seul. La première étape consiste à identifier et à isoler le fragment de génome codant pour la protéine d'intérêt, si la séquence est connue au préalable. Si la séquence d'un épitope est déterminée à partir de la séquence des acides aminés de la protéine purifiée, il faudra alors la synthétiser par voie chimique à partir de l'ARN messager (ARNm).

Le pouvoir antigénique du vaccin est fondamental, c'est lui qui suscite la synthèse d'anticorps protecteurs.

Exemple : La toxine botulinique induit la production d'antitoxines assurant la protection hautement spécifique de l'animal producteur. Le gène codant pour la toxine sera identifié (par voie descendante ou ascendante).

- Choix des vecteurs (de transfert et/ou d'expression)

L'ADN synthétisé ou le fragment d'ADN génomique isolé doit être porté par un vecteur (plasmide, cosmide, bactériophage), capable de se répliquer et d'être transféré dans une cellule (l'hôte adéquat).

- Clonage de l'ADN recombiné

Le mélange d'ADN hybrides recombinés (ADN vecteur et fragments d'ADN à insérer) peut être introduit dans une bactérie par transfert (plasmide) ou par infection (bactériophage) ou dans une cellule eucaryote en culture par transfection (ADN nu) ou par infection avec un virus à ADN.

Le plasmide recombinant transféré dans une bactérie va s'auto répliquer sans affecter la croissance de la cellule bactérienne. En étalant ces bactéries diluées sur de la gélose stérile, il sera possible d'isoler des colonies bactériennes correspondant chacune à une bactérie contenant un plasmide recombiné (clone bactérien). A l'inverse, le bactériophage recombinant va se reproduire en provoquant, lors du cycle lytique, la lyse des bactéries. Dans ces conditions l'on isolera des plages de lyse sur un tapis de bactéries correspondant à l'infection par un bactériophage recombinant.

- Identification du clone recombinant :

Il s'agit d'identifier, d'aller « pêcher » le clone bactérien ou cellulaire, la plage de lyse, contenant l'ADN recombinant recherché.

A cet effet, il est utilisé des marqueurs de sélection, associés au vecteur ou au fragment d'ADN à détecter (gènes de résistance aux antibiotiques des plasmides, gène normal pour un hôte muté pour ce marqueur).

Des sondes moléculaires peuvent aussi être utilisées pour rechercher le bon clone dans une population hétérogène par hybridation in situ.

-Exemples de vaccins recombinants en santé humaine et animale

6.2.2.3. Vaccins recombinants sub unitaires

Une partie isolée ou synthétisée de la protéine d'enveloppe d'un virus ou d'une protéine de surface d'une bactérie d'intérêt peut être utilisée comme voie alternative à la place de ces microorganismes. Les clones recombinants de bactéries (ou de levures) produisent ces protéines en grandes cultures qui sont ensuite purifiées et utilisées comme vaccin.

6.2.2.4. Vaccins recombinants vivants :

Il s'agit de vaccins constitués d'un vecteur vivant, viral ou bactérien, dépourvu de virulence pour l'espèce à vacciner, que l'on a rendu capable, par génie génétique d'exprimer un ou plusieurs antigènes hétérologues susceptibles d'induire une immunité protectrice contre le pathogène dont ils proviennent.

6.2.2.5. Vaccins recombinants réalisés dans le monde :

- le vaccin vivant recombinant à partir d'une souche recombinante de *Bacillus anthracis* exprimant un épitope immunogène de *Clostridium perfringens* (J, C, SIRARD *et al* 1997, AMS).
- Le vaccin vivant recombinant thermostable contre la peste bovine utilisant une souche recombinante du virus de la vaccine (cow pox), exprimant la protéine d'enveloppe immunogène du virus de la peste bovine (ILMB, UC DAVIS, CA, USA, 1997).

6.2.2.6. Le projet de fabrication de vaccins recombinants au Sénégal :

- Un vaccin recombinant bivalent contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique, utilisant une souche avirulente recombinante de *Bacillus anthracis* utilisée comme vecteur d'expression et exprimant l'épitope immunogène de *Clostridium chauvoei* est en cours de réalisation au Sénégal (Mbengue, 2008).
- Un vaccin recombinant contre le botulisme des types C et D est aussi envisagé.

6.2.2.7. Les différents types de vaccins actuels

- Les vaccins entiers
- Le vaccin vivant atténué de Louis Pasteur

Les vaccins animaux :

L'obtention d'une souche atténuée de *B.anthraxis* a été essentielle pour le développement du premier vaccin vétérinaire efficace contre le charbon. Après l'expérience de Pouilly le Fort en 1881, un grand nombre de cheptels étaient vaccinés dans toute l'Europe et en Amérique du sud, diminuant considérablement l'impact de la maladie sur les animaux domestiques (Friedlander *et al.*, 2002). Ce vaccin vivant était atténué par la chaleur et était constitué à partir d'un bouillon de culture et contenait donc des formes végétatives de la bactérie.

Ce vaccin fut utilisé jusqu'en 1935, date à laquelle une nouvelle souche et un nouveau conditionnement furent mis en place. Cependant, les vaccins atténués par la chaleur présentaient un problème de forte variation de virulence entre les différents lots (Hambleton et Turnbull, 1990).

De plus, des travaux ont démontré une efficacité moindre des vaccins à base de formes végétatives comparativement aux vaccins à base de spores (Chen *et al.*, 2006 ; Aloni-Grinstein *et al.*, 2005).

- Le vaccin Sterne à base de spores d'une souche atténuée

En 1937, Max Sterne développa une souche de *B.anthraxis* atténuée, acapsulée et stable. L'utilisation de ces spores comme vaccin vétérinaire fut d'une grande efficacité et son innocuité en fait encore de nos jours le vaccin de choix pour les animaux domestiques. Une seule dose engendre une immunité efficace, des rappels annuels restants nécessaires (Hambleton *et al.*, 1984).

Toutefois, ce type de vaccin présente une virulence résiduelle, écartant la possibilité de son utilisation chez l'homme dans les pays développés, excepté pour le vaccin russe (Welkos et Friedlander, 1988).

Les vaccins humains :

- Le vaccin russe

Le vaccin russe est un vaccin vivant à base de spores de souches atténuées, utilisé à la fois dans un cadre médical et vétérinaire (selon leurs propres normes de santé publique). En 1940, deux souches atténuées acapsulées furent isolées :

La souche STI-1 et la souche n°3 (Shlyakhov et Rubinstein, 1994) apparentées à la souche Sterne. Après des essais concluants en laboratoire, la souche STI-1 a été utilisée pour la vaccination du bétail en très large proportion. Pour le vaccin humain, un mélange de deux souches est utilisé encore aujourd'hui avec deux modes d'administration, soit par scarification, soit par injection sous cutanée. Un rappel annuel est nécessaire et les deux modes ont montré une bonne efficacité contre le charbon cutané, cependant aucune donnée concernant l'immunisation contre une infection par inhalation n'est disponible (Shlyakhov, 1994).

- Les vaccins acellulaires

Les vaccins acellulaires sont obtenus par purification d'antigènes de surnageants de cultures de *B.anthraxis*. Ils sont principalement basés sur l'obtention de la protéine PA. Les perfectionnements du milieu de culture utilisé, des procédures de fermentation de la sélection des souches utilisées et des procédés de production, ont conduit au développement de vaccins efficaces dans les années 1950.

- Le vaccin anglais

Le vaccin anglais a été développé en 1950 et fut breveté en 1979 (Turnbull, 2000). Il est essentiellement constitué de la protéine PA et provient d'un surnageant de culture de la souche Sterne 34F2 filtré à 0,2µm ; PA est ensuite précipité avec du phosphate d'aluminium. Cependant, des traces de EF et LF ainsi que d'autres protéines constituant de l'enveloppe bactérienne, sont présentes et induisent chez l'homme un fort taux d'anticorps (Ac) anti-EF ou LF comparativement au vaccin américain (Whiting *et al.*, 2004). L'inoculation se fait par voie intramusculaire avec trois doses à 0, 3 et 6 semaines, suivie d'une dose à 6 mois. Un rappel annuel est ensuite nécessaire.

Des effets secondaires locaux (œdème, douleurs, érythème) et/ou systémiques (fièvre, malaises, syndrome pseudo grippal) notables ont été relevés (Enstone *et al.*, 2003).

- **Le vaccin américain**

Le vaccin protéique AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed) fut produit pour la première fois dans les années 60 suite à une modification du protocole d'obtention de la protéine PA mis au point par Wright et Puziss en 1957 (Wright et Puziss, 1957). PA est obtenu à partir d'un surnageant de fermentation de la souche atténuée V770-NP1-R acapsulée, non protéolytique et le filtrat est ensuite adsorbé sur de l'hydroxide d'aluminium. Le protocole de vaccination comprend une injection par voie sous-cutanée à 0, 15 et 30 jours, puis une nouvelle injection à 6, 12 et 18 mois avec, par la suite des rappels annuels.

L'efficacité du vaccin a été testé sur plusieurs animaux de laboratoire (souris, cobaye, lapin, primate non-humain) et a montré des variations notables de l'épreuve d'infection par inhalation entre espèces et en fonction de la souche utilisée (Ivins *et al.*, 1998 ; Fellows *et al.*, 2001). Des effets secondaires sont parfois observés avec des effets locaux (rougeurs, induration, œdème, prurit, douleur) et des effets systémiques.

VII. Mesures prophylactiques

Chez l'animal : le plan de prophylaxie recommandé est le suivant :

- En milieu indemne, pratiquer la vaccination sur animaux de tous âges y compris les veaux. Renouveler la vaccination 6 à 12 mois plus tard.
- En milieu infecté, faire une sérovaccination car les animaux peuvent être en infection latente. A défaut, on peut faire une vaccination simple.
- Mise en route d'un traitement antibiotique prophylactique, idéalement dans les 24 heures : Ciprofloxacine ou doxycycline en première intention.

L'amoxicilline peut être utilisée en relais chez la femme enceinte si l'antibiogramme de la souche en circulation dans le foyer est connu.

Chez l'homme : Le suivi médical permet d'adapter l'antibioprophylaxie en fonction des résultats des prélèvements, de prendre les décisions adaptées en fonction de ses effets indésirables, de détecter éventuellement l'apparition de signes cliniques et pour une prise en charge psychologique des victimes, notamment dans les cas de bioterrorisme.

Le rythme minimal de consultations est inférieur à 48 heures après le démarrage de l'antibioprophylaxie, puis une fois par semaine.

En cas de soins à des patients atteints de charbon, le traitement n'est pas recommandé pour le personnel soignant ou pour le personnel de la morgue si les précautions standard sont respectées.

A rappeler qu'il n'y'a pas de transmission interhumaine. La durée de l'antibiothérapie est fonction du type d'exposition : en cas d'exposition par inhalation, du fait de la persistance potentielle des spores après une possible exposition par aérosol, la prophylaxie devrait être poursuivie pendant au moins trente jours et malgré l'absence de données claires, une antibiothérapie plus longue (jusqu'à 60 jours) pourrait être indiquée.

Des indications précises pour chaque modalité d'exposition sont disponibles dans les "Recommandations thérapeutiques pour la prise en charge des patients exposés à *Bacillus anthracis* dans des circonstances naturelles".

DEUXIEME PARTIE

Travail Personnel

PRESENTATION DU TRAVAIL

L'anthrax fut la première maladie à être attribuée à un microbe spécifique suite aux travaux de Davaine en 1863. Il s'agit de la première infection animale pour laquelle un vaccin a été mis au point par Pasteur, en 1881.

Les risques de voir apparaître des cas de charbon chez l'homme et l'animal dans les pays en développement sont liés à plusieurs facteurs notamment la méconnaissance de la maladie par les éleveurs, l'abandon de la vaccination dans certaines zones, des raisons économiques qui mènent à ne pas rechercher de manière systématique les causes de la mort d'animaux dans un cheptel.

Il y'a aussi le non enlèvement des carcasses des petits ruminants lors de la mort non définie et tout particulièrement en raison du coût, la reprise des abattages clandestins avec la consommation familiale de la viande, la reprise des enfouissements clandestins dans certaines localités, l'oubli de l'emplacement exact des « champs maudits » (emplacement de l'enfouissement de carcasses d'animaux contaminés) :

Quelques épidémies limitées ont été décrites dans la sous région ouest africaine

Au Sénégal :

- Durant la période allant de l'année 2000 à 2011, une trentaine de cas d'anthrax ont été diagnostiqués positifs , précisément au LNERV et ont concerné une vingtaine de bovins et une dizaine de petits ruminants (moutons et chèvres) dans trois principales zones à savoir celle des Niayes de Dakar, de Ziguinchor, et de Saint Louis. Des cas de charbon ont été diagnostiqués positifs par le LNERV, en 2009, 2010, 2011, 2013, 2014 sur des chevaux de certains Harras basés dans la localité de Rufisque de la région de Dakar, où des mortalités importantes ont été notées (Rapport Annuel, LNERV – ISRA, 2009, 2010, 2011, 2013, 2014).
- . Ainsi, quatre cas ont été signalés au Sénégal dont deux dans la zone des Niayes dont une vache « *Holstein* » importée et un mouton « *touabire* » (ferme laitière de Wayembam) de même qu'une autruche du parc forestier et zoologique de Hann à Dakar. Il est aussi à signaler un cas en République de Gambie chez un bovin de race « *Ndama* » trypanotolérante (Laboratoire Central vétérinaire d'Abuko) mort à la suite d'infection. (Résultats du diagnostic courant LMPA, 2008, 2010).

Le point sur l'état actuel des connaissances sur *Bacillus anthracis* de même que l'optique de la préparation d'une souche vaccinale recombinante, s'avèrent importants à plus d'un titre et nous permet de mieux mener notre étude sur la génomique et d'envisager des études sur la recombinaison génétique à partir de vecteurs de gènes codant pour des antigènes immunogènes ciblés.

A cet effet, et pour notre 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 classiques et par la suite par les méthodes moléculaires. un 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 de *Bacillus anthracis* dans diverses régions du monde ((Keim, P., A *et al.*, 2000)

Les objectifs principaux de cette thèse sont axés d'abord sur l'identification des séquences génomiques de *Bacillus anthracis* pour des souches sénégalaises et gambienne par comparaison avec d'autres souches de références et sur l'étude du pangénome de ces souches.

Tout d'abord, nous avons caractérisé ces souches de *Bacillus anthracis* par les méthodes bactériologiques classiques, ensuite moléculaires ce qui nous a permis de confirmer l'identité de chacune d'entre elles.

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 (Mbengue, thèse 2001 ; Mbengue M, 2008) afin de lutter efficacement contre cette zoonose d'intérêt vétérinaire et humaine.

Ainsi pour une meilleure cohérence scientifique, nous aborderons dans un premier temps le travail réalisé par les méthodes classiques et dans un deuxième temps, celui mené en biologie moléculaire concernant la PCR, le séquençage, l'analyse génomique de ces souches sénégalaises et Gambienne de *Bacillus anthracis*, de même que l'étude pangénomique.

I. SITES DE L'ETUDE

1.1. Zones et Périodes d'Etude :

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 (figure.15).

Les coordonnées géographiques de ces sites sont les suivants :

- Niague : $14^{\circ}48'33.30''N$, longitude : $17^{\circ}15'06.64''O$
- Localité Gambienne : $13^{\circ}28'N$ et $16^{\circ}34'O$
- Parc forestier de Hann

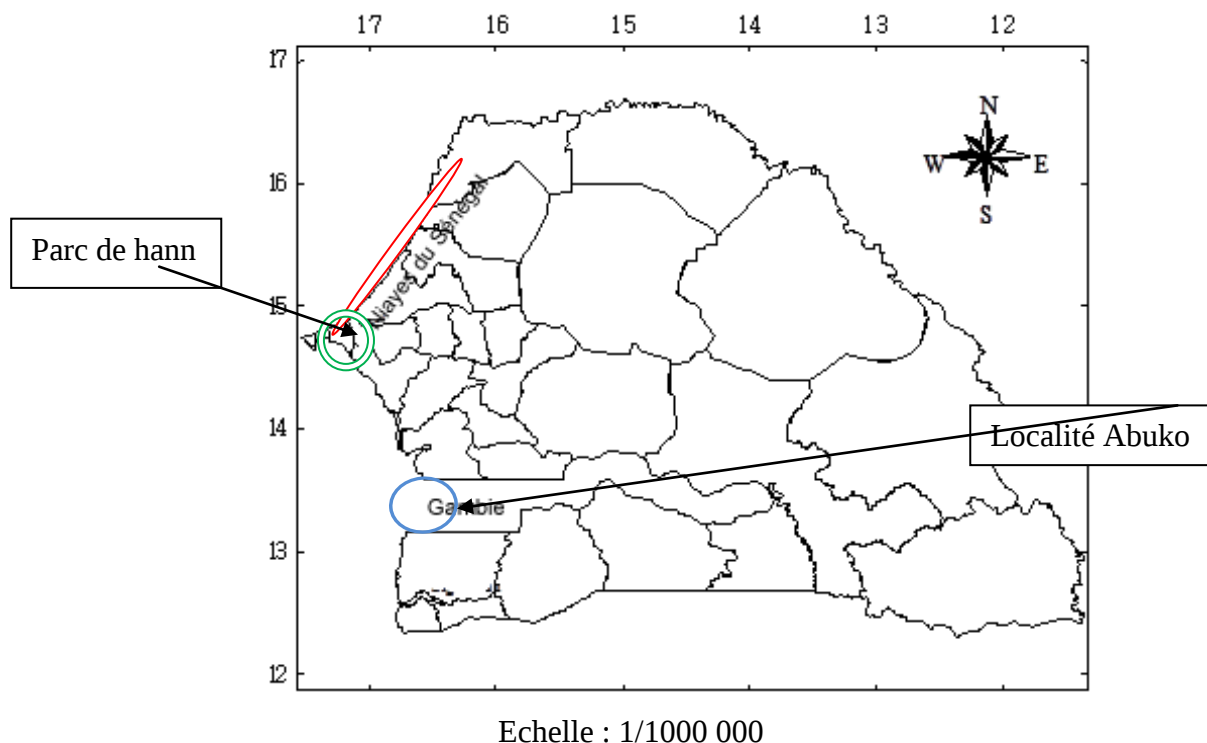


Figure 18 : Sites d'études : localité des Niayes - Parc Forestier de Hann (République du Sénégal)
Localité d'Abuko (République de Gambie).

- La zone des Niayes

Elle constitue une bande cotière de quelques dizaines de kilomètres de large située au Nord Ouest du Sénégal, entre la région de Dakar et la région de Saint-Louis.

Elle est comprise entre les isohyètes 400 mm et 600 mm ; cependant, grâce à l'influence du courant froid des Canaries et aux alizés qui tempèrent l'aridité du climat général de l'intérieur du pays soumis à l'harmattan, cette zone écologique bénéficie d'un microclimat particulier caractérisé par des températures modérées et une humidité relative assez élevée. La pluviométrie enregistrée au cours des années est relativement faible en moyenne de 500 mm.

Le relief est caractérisé par une série de bandes dunaires et de cuvettes interdunaires qui recèlent des groupements végétaux particuliers. Vers le continent, le cordon littoral se termine par un front élevé où s'accumule le sable avant de progresser vers l'intérieur : c'est le front continental du cordon littoral.

Cette zone surplombe la «Niaye» proprement dite qui est constituée d'un peuplement dense de palmiers à huile (*Elaeis guinensis*) situé dans un bas-fond inondé lors de fortes pluies. Cette «Niaye» est prolongée par une grande cuvette marécageuse en certains endroits et dans laquelle sont pratiquées des cultures maraichères et fruitières.

Au delà de la zone humide, apparaît une végétation de zone plus sèche avec un tapis graminéen composé de différentes espèces (*Pennisetum pedicellatum*, *Cenchrus biflorus*) et buissons à *Guiera senegalensis*. Cette dernière espèce forme par endroits des peuplements assez importants qui définissent la limite orientale de cette zone humide.

L'élevage de bovins et de caprins communément appelés chèvres du Sahel est l'une des activités traditionnelles de la zone.

L'échantillon de vache « *Holstein* » de même que celui du mouton « *touabire* » sont originaires de la localité de Niague plus précisément de la ferme laitière de Wayembam, située à Niague et à une vingtaine de kilomètres de la région de Dakar :

Ferme laitière de Wayembam : Il s'agit d'une laiterie moderne située du côté de la localité de Wayembam (4 Km de Rufisque dans la localité de Niague), peu connue des sénégalais dans la zone des Niayes.

Le parc forestier de Hann

L'échantillon d'autruche est originaire du parc forestier et zoologique de Hann à Dakar. Ce parc constitue une réserve naturelle située dans le territoire administratif de Dakar.

- La zone gambienne

La Gambie est un pays très étroit qui s'étend de part et d'autre du fleuve Gambie : sa largeur ne dépasse pas les 48 Km. La Gambie est un pays côtier de l'Océan atlantique, avec son arrière pays qui a la particularité d'être enclavé dans le Sénégal. Ce pays de l'Afrique de l'Ouest présente un climat tropical avec un été chaud et humide et un relief constitué de plaines marécageuses et quelques collines. Les ressources naturelles sont constituées par le poisson. Ce pays dispose de terres cultivables (18%) de pâturages permanents (9%) de forêts (28%), terres irriguées (150km²). La superficie est de 11 300 Km² avec 80 Km de côtes.

La saison des pluies va de juin à septembre, avec des précipitations de 900 à 1 400 mm (croissantes d'est en ouest).

L'échantillon de bovin de race « *Ndama* » trypanotolérante, est précisément originaire de la localité d'Abuko (LCV) :

Abuko est située dans la localité ouest de la Gambie (Sérékunda) , non loin de l'aéroport international de la Gambie et de la réserve naturelle. La population était estimée à 7631 habitants en 2008.

1.1.2. Périodes d'étude

Les différents prélèvements ont été réalisés en Février, Avril, Juillet 2010 pour les souches sénégalaises et Septembre 2011 à la fin de la saison hivernale pour la souche gambienne.

1.2. Cadre de l'Etude :

Ainsi les études d'isolement et d'identification de ces souches bactériennes par les méthodes classiques ont été menées au Laboratoire de Microbiologie et Pathologies aviaires (LMPA) du Laboratoire National d'Elevage et des Recherches Vétérinaires (LNERV) de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA).

Les travaux de biologie moléculaire sur le micro séquençage des gènes et d'analyse génomique par la bio informatique ont été menés en collaboration avec l'Université de la Méditerranée (Université Aix – Marseille II – d'Aix en Provence)

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Echantillonnage

2.1.1. Animaux et souches du Sénégal et de la Gambie

Sénégal : trois souches :

- Le bovin de race « *Holstein* » est une femelle de trois années d'âge et qui a été sélectionnée dans la ferme de Wayebam grâce à ses aptitudes laitières avec un poids de 8000 kg. Cet animal a hébergé la souche n°1 : *Bacillus anthracis* isolée le 09 Février 2010 à partir d'organes (Ganglion, rate, poumon, foie) (**SEN1 = n° 124 21 899**) :
- Une Autruche âgée de 6 ans du parc zoologique de Hann Dakar, trouvée morte à la suite de maladie. L'autruche du nom scientifique *Struthio camelus* de la classe des oiseaux, de l'ordre des *Struthioniformie* a pour habitat le continent africain. Elle a un poids de 150 kg et de régime alimentaire herbivore. Il s'agit de l'animal le plus rapide des oiseaux pouvant atteindre une vitesse de 70 km/h. Cette autruche est originaire de la ferme de Bandia (Localité de Mbour – Banlieue du Sénégal - 50 Km de Dakar). La souche n°2 : *Bacillus anthracis* a été isolée à partir des poumons de cette autruche mâle , morte en Juillet 2010 (**SEN 2 = n° 124 21 900**)
- Un mouton de race « *Touabire* », disposant d'une fertilité et d'une fécondité très améliorée par rapport aux autres races telle que la Djallonké. Ce mouton est un mâle de race Touabire de 2 ans d'âge : il a une grande taille allongé avec une forte tête qui porte des cornes prismatiques. La base des jambes est large et grêle et a présenté un pelage blanc. La souche n°3 : *Bacillus anthracis*, isolée 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 :

- Un bovin de race « *Ndama* » trypanotolérante. Ce bovin mâle est à 4 ans d'âge et porte des cornes courtes. Il s'agit d'un taurin nain Souche n°1 : *Bacillus anthracis*, isolée sur 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**)

Les différentes souches à tester ont été obtenues à partir de prélèvements sanguins effectués, il y'a eu que quatre cas positifs dont les souches ont pu être isolées, purifiées et conservées à très basse température pour la réalisation de nos travaux.

2.1.2 Souches de références : Il s'agit des 6 souches suivantes :

CDC 684 (Richard, T *et al.*, 2008), Sterne, A0248 , H9401 (Read, TD *et al.*, 2002), Ames ancêtre (Ravel, J *et al.*, 2009) et Ames (Read, TD., 2003).

CDC 684

- NCBI :

***Bacillus anthracis* str. CDC 684.** Cette souche est aussi connue sous les codes NRRL 3495 et NRS 234.

Caractères bactériologiques:

- **Morphologie**

- Gram : +
- Forme : Bacillaire
- Motilité : motile
- Mobilité : immobile

- **Environnement**

- Température de croissance : 37°C, Mésophile
- Maladie : anthrax

(<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/477>)

Sterne

- NCBI :

***Bacillus anthracis* str. Sterne.** Cette souche porte le plasmide responsable de la toxicité mais pas le plasmide pXO2 et est par conséquent avirulente mais toxique. Il s'agit de la contrepartie de la souche Pasteur qui porte le plasmide pXO2 mais pas le pXO1. Cette souche est souvent utilisée pour le développement de vaccins.

Caractères bactériologiques

- **Morphologie**

- Gram : +
- Forme : Bacillaire
- Motilité : Motile
- Mobilité : immobile

- **Environnement**

- Oxygène moléculaire : Facultative
- Température de croissance : 37°C, Mésophile
- Habitat : Varié
- Maladie : Anthrax

A0248

- NCBI:

Isolat humain

***Bacillus anthracis* strain A0248.** Cette souche (96-10355; K1256) a été isolée à partir d'un humain atteint d'anthrax dans l'Etat de l'OHIO aux USAMRIID.

H9401

(<http://jb.asm.org/content/194/15/4116.full.pdf>) ==> isolat coréen sur un humain atteint d'anthrax.

Ames ancestor

- NCBI:

Bactérie formant des spores et pouvant causer l'anthrax, elle constitue un standard pour les génomiques comparatives.

***Bacillus anthracis* str. Ames ancestor.** C'est le type de souche libellé (0581, A2084, genotype 62, Group A3.b) pour *Bacillus anthracis* et renferme les deux plasmides, pX01 and pX02, qui codent respectivement pour l'anthrax toxine et la capsule, formant une souche virulente. Cette souche est considérée comme le "gold standard" pour *B. anthracis*. La fiche descriptive de cette souche est disponible ici.

(<http://jb.asm.org/content/191/1/445.full>)

Ames

- NCBI:

Genome de Référence, Community selected, UniProt : [*Bacillus anthracis* str. Ames](#)

***Bacillus anthracis* str. Ames.** Elle assure une meilleure étude de la souche en laboratoire (isolat) qui n'est pas virulent car ayant perdu ses deux plasmides, pXO1 et pXO2." (Information du NCBI) (Rasko *et al.*, FEMS Rev 2005 ; Read TD *et al.*, Nature 2001 ; Keim P, *et al.*, J Bacteriol, 2000). Fiche descriptive de la souche Ames :(<http://www.straininfo.net/genomes/309>).

Tableau III : Fiche descriptive de la souche Ames (Keim P, *et al.*, J Bacteriol, 2000).

Nom du microorganisme	<i>Bacillus anthracis</i> souche. Ames
Etat de la séquence	Complète
Taille du génome	5.2273 Mb
G + C %	35.4 %
Forme	Batonnet
Dispositions	seul, Paire, Chaînes
Endospores	Présentes
Motilité	Motile
Mobilité	Immobile
Oxygène moléculaire	Facultative
Habitat	Varié
Température de croissance	Mésophile
Maladie causée	Anthrax

2.2. Méthodologie

Nous avons procédé à une analyse bactériologique et moléculaire. Une interprétation des séquences génomiques obtenues par la méthode bio informatique, a été menée par utilisation de différents logiciels et outils informatiques dont trois principalement :

- **Logiciel COG** (Cluster of Orthologues Groups) nécessaire pour l'analyse fonctionnelle des génomes (Tatusov, RL *et. al.*, 2003)

- **Logiciel KEGG** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) utile pour mieux comprendre l'analyse métabolique des génomes. Ce logiciel est surtout utilisé après l'identification des gènes impliqués dans des phénotypes d'intérêt. (Kaanchisa M *et.al.*, 2000)
- **Logiciel PCA** (Analyse de la composante principale ou **P**rinciple **C**omponent **A**nalysis) utilisé pour l'analyse statistique des génomes (Bengio, Y, *et.al.*, 2013)

Deux méthodes informatiques ont aussi été utilisées à savoir :

- **Méthode d'alignement - MAUVE** (Alignement multiple du génome en présence d'événements évolutifs ou **M**ultiple **G**enome **A**lignement ou Molecular Evolutionary Genetics Analysis) qui est une méthode d'alignement. (Darling, AE, *et.al.*, 2010)
- **MEGA5** (Analyse moléculaire génétique évolutive ou Molecular Evolutionary Genetics Analysis) qui est une méthode intégrée pour la réalisation d'alignement de séquences et d'inférer des arbres phylogénétiques. (Tamura, K *et.al.*, 2011)

Ces travaux nous ont par ailleurs permis de réaliser une importante étude pangénomique de ces souches de *Bacillus anthracis*.

Le protocole suivant a été mis en œuvre pour notre étude.

2.2.1. Etude bactériologique

Test réalisé au LNERV – ISRA (Dakar – Sénégal) :

Les prélèvements d'organes réalisés dans les différents sites selon des procédures biosécuritaires, ont été mis en culture dans un milieu liquide constitué de bouillon ordinaire.

La procédure utilisée pour la mise en œuvre de cette étude bactériologique, fait référence à celle menée par Leon Leminor *et al.*, (Leminor *et al.*, 1989) :

Ensemencement, isolement sur gélose au sang de mouton (hémoculture) qui est incubé comme précédemment.

La coloration de Gram a été effectuée sur les colonies des isolats. L'ensemencement de la gélose au sang de mouton pour l'étude des caractères biochimiques.

La production de l'Acetyl Méthyl Carbinol (AMC) ou acétoïne : elle est étudiée par la réaction de Voges Proskauer (VP) de même que la fermentation de certains sucres a été réalisée.

Les caractères culturels, morphologiques, biochimiques ont été étudiés dans le détail selon les méthodes classiques.

Une épreuve est aussi pratiquée pour l'étude du pouvoir pathogène expérimental (PPE) chez la souris : elle consiste à inoculer 500 µl de la souche isolée en culture par voie intra péritonéale et de suivre l'animal pendant 24 Heures : a la mort, une autopsie est pratiquée puis un frottis par apposition sur la rate hypertrophiée est réalisé : le frottis est par la suite coloré par la méthode de Giemsa et observé au Microscope.

Dans la mise en œuvre de cette étude du PPE qui a été réalisée sur souris blanches Balb/C : deux souris essais ont reçu 500 µl de la culture bactérienne par voie intra péritonéale et deux autres souris témoins n'ont reçu que 500 µl du tampon physiologique : ces souris ont fait l'objet d'un suivi au laboratoire.

A la mort des souris, l'autopsie est réalisée de même que la mise en évidence de *Bacillus anthracis* par confection de frottis par apposition au niveau de la rate suivie d'une technique de coloration par la méthode Giemsa.

Mise en évidence de la capsule : elle est réalisée en déposant sur une lame une goutte de suspension bactérienne à laquelle une goutte de colorant d'encre de chine est ajoutée. . L'existence de la capsule est caractérisée par la présence d'un halo clair autour de la bactérie : la capsule est souvent produite dans les produits pathologiques.

Travail de mise en œuvre au laboratoire de recherche de l'URMITE (Marseille, France) :

Il s'agit d'un travail axé sur la mise en culture des échantillons et des hémocultures nécessitant impérativement le passe – plat du NSB 3 (Laboratoire de Biosécurité de Niveau 3) de la Faculté de Médecine, les géloses COS, Mac Conkey et des écouvillons stériles :

1ère Etape : Ensemencement du prélèvement sur une gélose Columbia à 5% de sang de mouton (Biomérieux) et une gélose Mc Conkey, en sachet et d'une analyse des colonies non ou faiblement hémolytiques après incubation.

2ème Etape : Emulsion des colonies suspectes (Bacilles à Gram +, immobiles, non ou faiblement hémolytiques) dans un tube avec Chelex pour une analyse de biologie moléculaire (CF PF6/BIO/Extraction).

3ème Etape : Conservation du prélèvement d'origine à + 4°C dans le réfrigérateur du L3 jusqu'au rendu du résultat.

2.2.2. Etude moléculaire

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie moléculaire de l'URMITE et a pour but de décrire les modalités d'extraction de l'ADN des agents pathogènes hautement contagieux en assurant une bonne application du guide des Bonnes Pratiques d'Exécution des Analyses (GBEA). Il respecte ainsi les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes suivant le protocole PO5/BIO/CFX-96 : Protocole d'utilisation du CFX 96 Biorad. (Voir Annexe3).

2.2.2.1. Extraction de l'ADN (CFX 96 Biorad. (Voir Annexe3)

2.2.2.2 Amplification par PCR en temps réel

L'ADN extrait de chaque isolat a été obtenu par des procédures qui peuvent être simplifiées par une approche nécessitant seulement une lyse des colonies.

Dans ce protocole, *Bacillus anthracis* a été isolée à partir d'une gélose au sang incubée à + 37°C pendant une nuit.

Pour chaque colonie isolée par plaque, nous avons procédé à une centrifugation dans des tubes contenant 200 µl de Tampon d'élution (TE) constitué par du tampon Tris Hcl à pH 8,0 et de l'EDTA à 1,0mM. Les colonies ont été ensuite remises en suspension par vortex ou par pipetage répété afin de bien homogénéiser. La suspension cellulaire a été chauffée à + 95°C pendant 20 minutes et refroidie à la température ambiante. Les débris cellulaires ont été obtenus après centrifugation à 15000 g pendant une minute. La centrifugation a été menée dans un endroit sécurisé. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube pour conservation..

Le procédé de la lyse thermique est plus rapide et plus facile et est la méthode la plus utilisée pour la majorité de nos échantillons.

Le mélange réactionnel est constitué de la façon suivante :

4 µl H₂O + 0,5 µlUDG + 10 µl de Mix + 0,5 µl d'amorce **S** + 0,5 µl d'amorce **R** 0,5 µl de Soude + 4 µl d'extrait ADN = 20 µl de volume de mélange réactionnel par puits au total : le gène à amplifier est le *Pag* et les deux amorces utilisés sont :

PA - S : CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA (séquence amorce S).

PA - R : CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT (séquence amorce R)

Intérêt utilisation du gène *Pag* : Le gène *Pag* de *Bacillus anthracis* est localisé au niveau du plasmide PXO1 (185Kb) et code pour l'antigène protecteur et est un élément pouvant agir avec les facteurs léthal et oedématogène composant du même plasmide. La synthèse de cet antigène protecteur a lieu durant la croissance en présence de teneur élevées en CO₂ ayant un effet important sur le niveau de transcription et le plasmide PXO1 code pour deux facteurs régulateur impliqués dans le contrôle de l'expression du gène *Pag*. (Constance A, *et.al.*, 2002)

La réaction au total comprend les éléments suivants :

Réaction :

1 X PCR tampon : 0,2 mM de dNTPS : 1 µl de Platinum à 0,04 U : Taq DNA Polymerase 0,04 U : 0,2 µg d'extrait d'ADN.

Le thermocycleur est programmé pour les réactions à mener : d'abord à + 94°C pendant 5 minutes pour activer l'ADN polymerase, ensuite à + 94°C pendant 20 secondes : 60°C pendant 20 secondes et 65°C pour 20 secondes : ces trois étapes sont ainsi répétées 34 fois. L'étape finale étant de 65°C pendant 5 minutes.

Après amplification, on procède à l'analyse automatique des amplicons par la technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose par le système Perkin Elmer Applied Biosystèmes.

Les gels obtenus après électrophorèse ont par la suite été analysés et la taille apparente des fragments d'ADN a été déterminée par le microséquençage par le système SOLID (Annexe 2) qui nous permis d'obtenir les éléments de comparaison par rapport à la souche de référence par GENBANK.

2.2.2.3. Microséquençage

La méthode de microséquençage que nous avons utilisée est celle du système SOLID 4 Life technologies.

La bibliothèque a été construite et jumelée à partir de 1 µg de l'ADN génomique extrait de chaque souche.

L'épreuve de séquençage a été réalisée à l'aide de 50 x 35 pb SOLiD™ (V4 chimie) sur une lame pleine associée à d'autres projets 96 sur un Applied Biosystems SOLiD machine 4.

L'ensemble de ces ADN génomiques au nombre de 96 a été codé à 96 code- barre avec les modules codes à barres 1 – 96 fournis par Life Technologies.

La sortie de la longueur de lecture a été comme prévue 85bp (50 x35bp).

3 des génomes *B anthracis*. (Sen2col-Sen3-Gmb1) ont été séquencés par les codes à barres E 3,2 E +6,3.1 +6,3.9 E +6 et lus alors que le génome d'une souche à savoir la Sen1 ayant généré moins de lectures (2.3E +6) n'a pu être lue : ce qui a conduit respectivement aux valeurs suivantes à 273Mb, 262Mb, 382Mb 188Mb et le projet de séquençage global de ces 4 génomes a procédé à l'utilisation de données à 1.1GB.

Le projet de séquençage global de ces 3 génomes a conduit à 917Mb de données.

2.2.2.4. Analyse génomique :

MLST : Multilocus sequence typing (MLST) est une technique de biologie moléculaire utilisée pour le typage de loci multiples ((M.C. Maiden *et al.*, 1998 ; Urwin *et al.*,2003).

Au cours de notre étude, nous avons eu à effectuer la caractérisation générale des souches utilisées, à mener une étude à partir de différents logiciels composés d'outils et de méthodes informatiques.

Une étude pangénomique a été réalisée 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.

Tableau : (tableau).

Nous avons opté pour la solution du mapping car l'assemblage de novo de reads SOLiD ne fonctionne pas (nombres de contigs énormes ...).

Trois outils informatiques ont été utilisés

Pour les outils informatiques nous avons eu à utiliser certains dont trois principalement :

- **Logiciel COG** (Cluster of Orthologues Groups) nécessaire pour l'analyse fonctionnelle des génomes

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

- **Logiciel KEGG** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) utile pour mieux comprendre l'analyse métabolique des génomes. Ce logiciel est surtout utilisé après l'identification des gènes impliqués dans des phénotypes d'intérêt.
- **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 :

- **Méthode d'alignement - MAUVE** (Alignement multiple du génome en présence d'événements évolutifs ou **Multiple Genome Alignment** ou **Molecular Evolutionary Genetics Analysis**) qui est une méthode d'alignement.

L'alignement multiple a été fait grâce à l'algorithme ClustalW. A partir de celui-ci, cet arbre fut généré via la méthode des distances, aussi connue sous le nom de Neighbor Joining.

Afin de générer tout ceci, nous avons utilisé le logiciel MEGA5.

- **MEGA5** (Analyse moléculaire génétique évolutive ou **Molecular Evolutionary Genetics Analysis**) qui est une méthode intégrée pour la réalisation d'alignement de séquences et la possibilité d'inférer des arbres phylogénétiques.

La construction de l'arbre phylogénétique est utilisée par les programmes d'alignement multiples de séquence afin d'éliminer une grande partie des alignements et de limiter ainsi le

temps de calcul. A l'heure actuelle la méthode des distances (Neighbour Joining) n'est plus la plus employée depuis la découverte de la méthode de l'inférence Bayésienne ou de Vraisemblance (méthode probabilité)

Avec le temps, il a pris de l'ampleur et inclut des outils pour l'alignement des séquences de reconstruction et de visualisation de l'arbre phylogénétique : à savoir tester un ensemble d'hypothèses d'évolution, assurer une estimation des divergences des séquences basée sur le web d'acquisition des données de séquences et des systèmes d'experts pour générer des descriptions en langage naturel de l'analyse des méthodes et données choisies par l'utilisateur (Kumar *et al.*, 2008 ; Kumar et Dudley, 2007).

Le Clustering hiérarchique (groupage hiérarchique ou Hierarchic Clustering) qui peut être considéré en temps qu'arbre phylogénétique d'autant plus que dans les options, nous avons demandé un Clustering optimal. D'une manière générale ; la procédure suivie pour cette analyse génomique est la suivante : L'alignement du pan-génome et du mobilome Tout d'abord, Nous avons effectué deux types d'alignements: un alignement global du génome de mauve (Darling *et al.*, 2010) et avec un alignement multiple MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) (en utilisant l'algorithme ClustalW) à la suite d'une reconstruction de l'arbre phylogénétique (méthode des distances, encore appelée méthode de jonction (Neighbour Joining ou procédé NJ) . Pour la mise en place de l'arbre phylogénétique, nous nous sommes basés sur le MLST (typage génomique multilocus), qui est composé de 7 gènes de ménage (*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* and *tpi*) (Kim *et al.*, 2005).

La méthode MAUVE et son fichier de sortie épine dorsale (Sheppard *et al.*, 2013), nous ont permis de calculer la proportion du génome de base en fonction de la taille du pan-génome, une épreuve qui nous a permis d'évaluer la nature fermée ou ouverte du pan-génome. Ensuite, nous avons utilisé le logiciel OrthoMCL (Chen *et al.*, 2006) pour obtenir une liste des orthologues afin d'en déterminer la composition du pan-génome (noyau, accessoire et les gènes uniques). Nous avons également utilisé le logiciel RAST (Aziz *et al.*, 2008) pour effectuer l'annotation des nouvelles souches et de leurs plasmides afin de trouver le mobilome. En ce qui concerne le mobilome, nous avons également utilisé le logiciel CRISPRfinder (Grissa *et al.*, 2007). Pour COG, KEGG et les résultats du mobilome, nous avons effectué une analyse en composante principale (ACP) en utilisant R, pour avoir une meilleure vue de la répartition des différentes classes.

Nous avons utilisé MeV (Saeed *et al.* 2006 ; Saeed *et al.*, 2003) (Afficheur multi Experiment) pour mieux visualiser la distribution des gènes accessoires et effectuer une classification hiérarchique. Nous avons également travaillé sur les SNP contenu dans le génome de base. Donc, nous ramenons ainsi les séquences de tous les gènes de base (en fonction du logiciel OrthoMCL) grâce à un script Perl et SNP utilisé comme viseur (Song *et al.*, 2011). Pour la mise en place de l'arbre phylogénétique, le génome de base et le rapport de transition / transversion, nous ont été d'un grand apport avec l'utilisation à nouveau de la méthode d'alignement MEGA.

2.2.2.5. Etude d'un pangénome :

L'étude pangénomique première du genre a été publiée en 2005 (Tettelin H *et al.*, 2005) et, depuis, ce genre d'étude a rapidement pris de l'ampleur. Ce travail sur le pan génome a permis une comparaison entre les différentes espèces ou souches.

CAMERA (Sun S, *et al.*, 2011) est un portail bioinformatique où nous pouvons faire plusieurs types d'analyse. Nous l'avons utilisé pour générer les données COG (Tatusov RL, *et.al.*, 2001). C'est un outil commun, utilisé pour attribuer les annotations fonctionnelles des protéines. Les protéines ont été classées en catégories (la liste est disponible à l'<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/palox.cgi?fun=all>). Pour obtenir ces données KEGG (Ogata H, *et.al.* 1999), il faut étudier les voies métaboliques : ainsi pour y parvenir nous avons utilisé les KAAS (KEGG serveur d'annotation automatique) qui est un outil en ligne.

En KEGG, les protéines ont été réparties entre les classes et sous-classes : . Tout d'abord, nous avons réalisé deux types d'alignements: un alignement du génome global avec MAUVE (Darling AE *et al.*, 2010) et un alignement multiple avec MEGA5 (Tamura K *et al.*, 2011) en utilisant l'algorithme Clustal W à la suite de la réalisation d'un arbre pour tous les génomes (méthode à distance, ou méthode de jonction).

III. RESULTATS

3.1. Les souches bactériennes

Les résultats sont consignés dans le tableau III suivant :

Tableau IV: Origine des souches de *Bacillus anthracis*

Code	Souches	Pays	Hôte	Origine des échantillons
G191	Sen1	Senegal	Vâche « Holstein »	Poumons
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	USA	Beefmaster femelle de 14 années d'âge	/
	Ancestor		Génisse	
/	A0248	USA	Humain	/
/	H9401	Korea	Humain	/
/	CDC684	USA	Humain	/
/	Sterne	UK	/	/

3.2. Etude bactériologique de *Bacillus anthracis* (méthodes classiques)

3.2.1. La culture de *Bacillus anthracis* :

L'étude des caractères culturels, morphologiques et biochimiques a donné les résultats suivants:

- En culture :

Sur bouillon ordinaire, après 24 heures d'incubation à + 37°C, nous avons noté l'apparition de flocons qui ont tendance à sédimenter au fond du tube, et laissant un surnageant assez clair.

Sur gélose ordinaire : nous avons observé la formation de grosses colonies de type R d'environ 4 mm de diamètre, d'aspect blanchâtre et à contours irréguliers.

Sur gélose au sérum : nous avons noté la présence de colonies de type S, justifiant ainsi la production de capsule par la bactérie.

En gélose profonde : les colonies sont lenticulaires et se sont développées sur toute la longueur du tube ; nous pouvons conclure que le germe est aéroanaérobie facultatif.

L'état frais entre lame et lamelle a montré des bacilles pratiquement immobiles.

L'examen du frottis coloré par la méthode de Gram a montré des bacilles en longues chaînettes à Gram + (figure 14) : Nous avons aussi noté la présence de spores non déformantes en position subterminale et même terminale sur la culture de 24 heures. La capsule était bien visible après coloration à l'encre de chine à partir du frottis par apposition réalisé sur la rate de la souris morte ayant subi l'inoculation de la bactérie.

Les résultats sont rapportés dans le tableau n°V suivant :

Tableau V: Caractères morphologiques et culturels

Souches	BO	GO	GS	GP	Gram	Mobilité	Motilité
Sen1	+	+	+	+	+	-	+
Sen2	+	+	+	+	+	-	+
Sen3	+	+	+	+	+	-	+
Gmb1	+	+	+	+	+	-	+

L'examen du frottis coloré par la méthode de Gram a montré des bacilles en longues chaînettes à Gram + (figure 19).

Nous avons aussi noté la présence de spores non déformantes en position subterminale et même terminale sur la culture de 24 heures. La capsule était bien visible après coloration à l'encre de chine à partir du frottis par apposition réalisé sur la rate de la souris morte ayant subi l'inoculation de la bactérie.

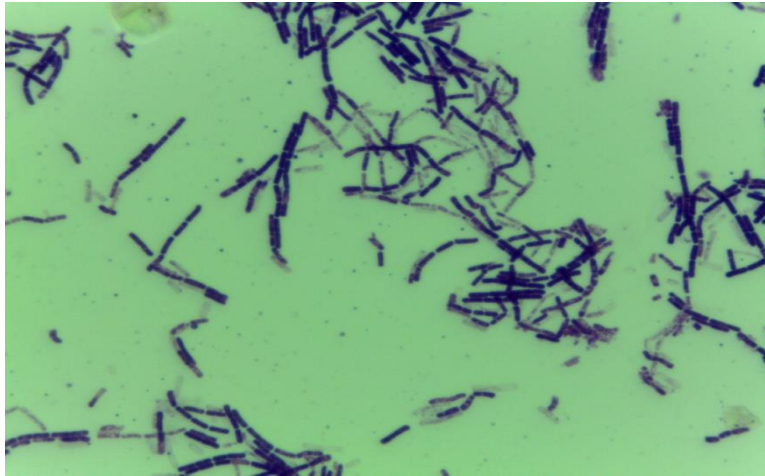


Figure 19 : Morphologie de *B.anthraxis* : Bacilles en longues chaînettes à Gram + (grossissement 100 du microscope ordinaire)

3.2.2. Etude des caractères biochimiques

Culot de gélatine : après piqure centrale et 24 heures d'incubation à + 37°C, nous avons noté une hydrolyse lente avec une culture limitée sur la partie supérieure du tube.

Milieu à base de lait : une coagulation a été observée.

Milieu gélosé au sang de mouton : une très légère hémolyse apparaissant lentement a été notée pour l'ensemble des souches testées.

Milieu Urée Indole : nous n'avons pas noté la production d'indole ni d'H₂S à partir des cultures obtenues sur milieu Kligler Hajna.

L'étude du pouvoir glucidolytique nous a montré une fermentation du glucose sans production de gaz (Milieu Kligler Hajna) de même que la fermentation des sucres suivants : Maltose, Saccharose, Lévéulose, Tréhalose et Dextrine.

Par ailleurs, nous avons noté une absence de fermentation du Lactose, du Galactose et de l'Arabinose.

Nous n'avons pas aussi observé l'hydrolyse de la Pénicilline, de l'Urée, mais nous avons noté la production d' Acétoïne.

Les résultats sont rapportés dans le tableau VI suivant

Tableau VI : Caractéristiques biochimiques

Souches	Gel	Lait	GS	Urée	Indole	Glu	Malt	Sacc	Lev	Treh	Dext	lact	Arab	Pen	AMC
Sen1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Sen2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Sen3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Gmb1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

3.2.3. Etude du Pouvoir Pathogène Expérimental (PPE)

La mort des souris essais est survenue vers 14 heures de l'après midi après une inoculation qui a eu lieu à 8 heures le matin : Les souris ayant reçu la souche bactérienne meurent ainsi 6 heures après l'inoculation, ce qui confirme bien les observations faites sur l'effet létal.

Après coloration à l'encre de chine et observation microscopique des cultures, nous avons noté la présence d'un halo clair autour de la bactérie confirmant ainsi l'effectivité de la capsule chez les quatre souches testées.

Le milieu de Mac Conkey et la gélose Columbia à 5 % de sang de mouton et a donné des colonies faiblement hémolytiques constituées par des bacilles à Gram +, immobiles.

Ces différents résultats obtenus confirment bien l'identification différentes souches testées comme étant du *Bacillus anthracis* par les méthodes dites classiques.

3.3. Etude moléculaire

Les colonies ont été traitées par la méthode PCR et ont donné les résultats suivants :

3.3.1. PCR EN TEMPS REEL

3.3.1.1. Souche N 899 – SEN1

Les résultats de l'amplification sont interprétés à la suite des différents signaux observés, et sont consignés dans la figure 20 suivante :

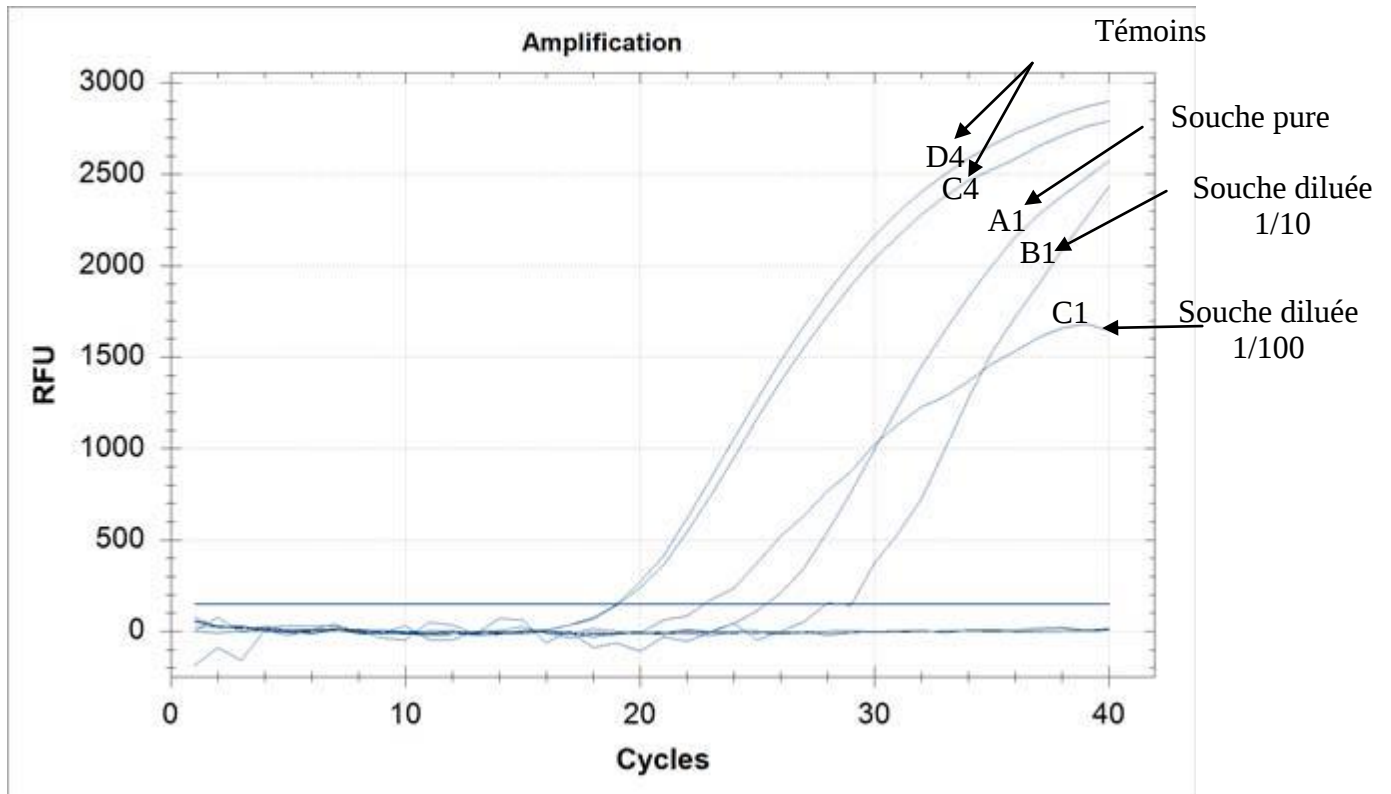


Figure 20: Résultats de détection des produits PCR avec les amorces R et S

Les premiers signaux commencent à être observés après 2 à 15 cycles et augmentent jusqu'à atteindre un maximum au bout de 40 cycles.

Les témoins positifs (D4 et C4) ont donné des signaux plus importants (souche de référence), tandis que les différentes concentrations de l'échantillon testées ont donné des signaux un peu moins importants que ceux des témoins positifs avec des valeurs décroissantes allant de la souche pure A1 (plus élevée) à la souche diluée au 1/100 C1 (valeur plus faible) en passant par la dilution au 1/10 correspondant à B1. Confirmation de l'identification de *Bacillus anthracis*.

On peut cependant constater que les témoins négatifs n'ont pas donné de signal comme attendu.

3.3.1.2. Souche n°900 Sen 2

Les résultats de l'amplification sont interprétés à la suite des différents signaux observés et qui sont consignés dans la figure 21 suivante :

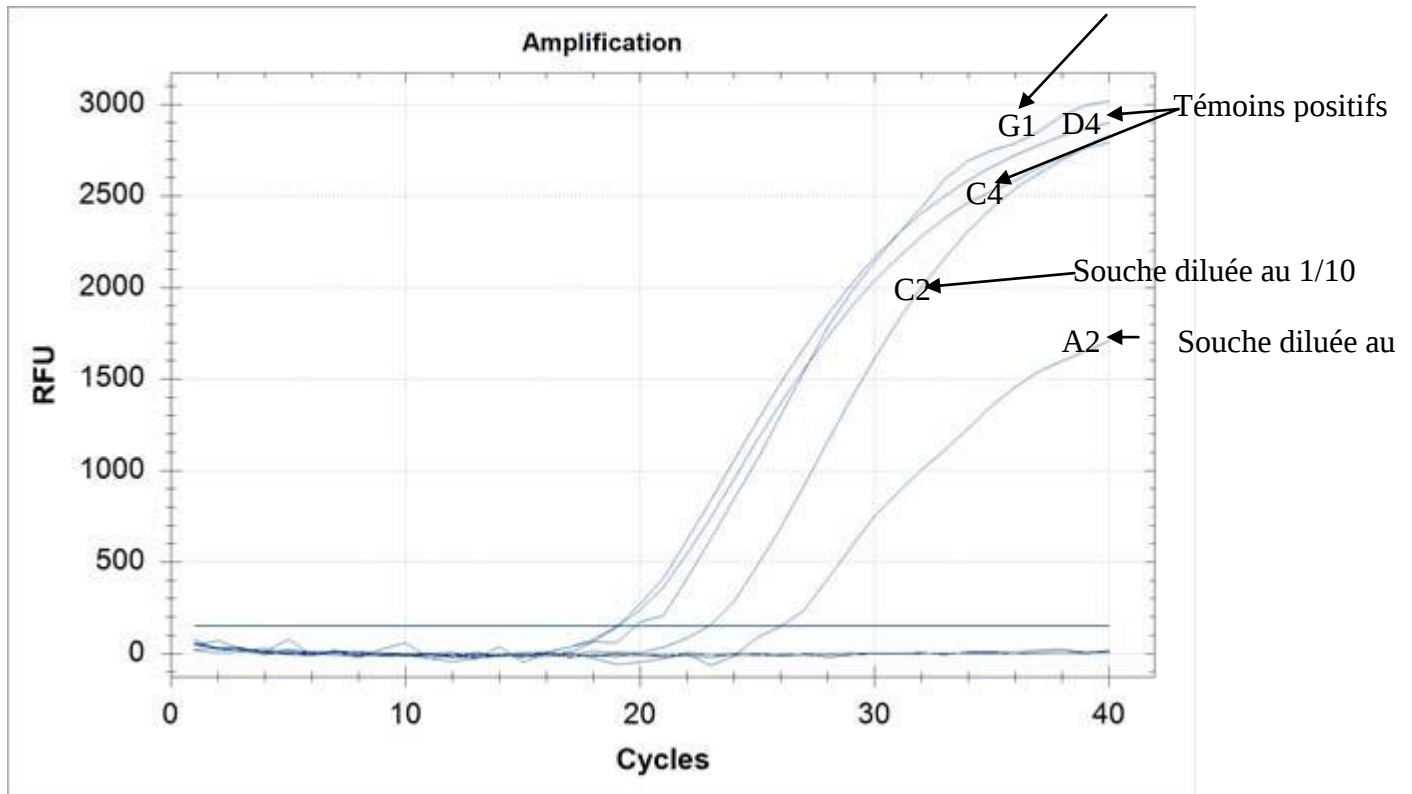


Figure 21 : Résultats de la détection des produits PCR plaque 2 avec les amorces R et S
Les premiers signaux apparaissent au 20^{ème} cycle et atteignent la valeur maximale au bout de 40 cycles.

Les témoins positifs ont donné des signaux moins importants que la souche pure (G1) tandis que les échantillons C2 (1/10) et A2 (1/100) ont donné des valeurs décroissantes : Confirmation de l'identité de *Bacillus anthracis*

Les témoins négatifs n'ont pas donné de signal ce qui se justifie

3.3.1.3. Souche n°901 Sen 3

Les résultats de l'amplification sont interprétés à la suite des différents signaux observés et sont consignés dans la figure 22 suivante

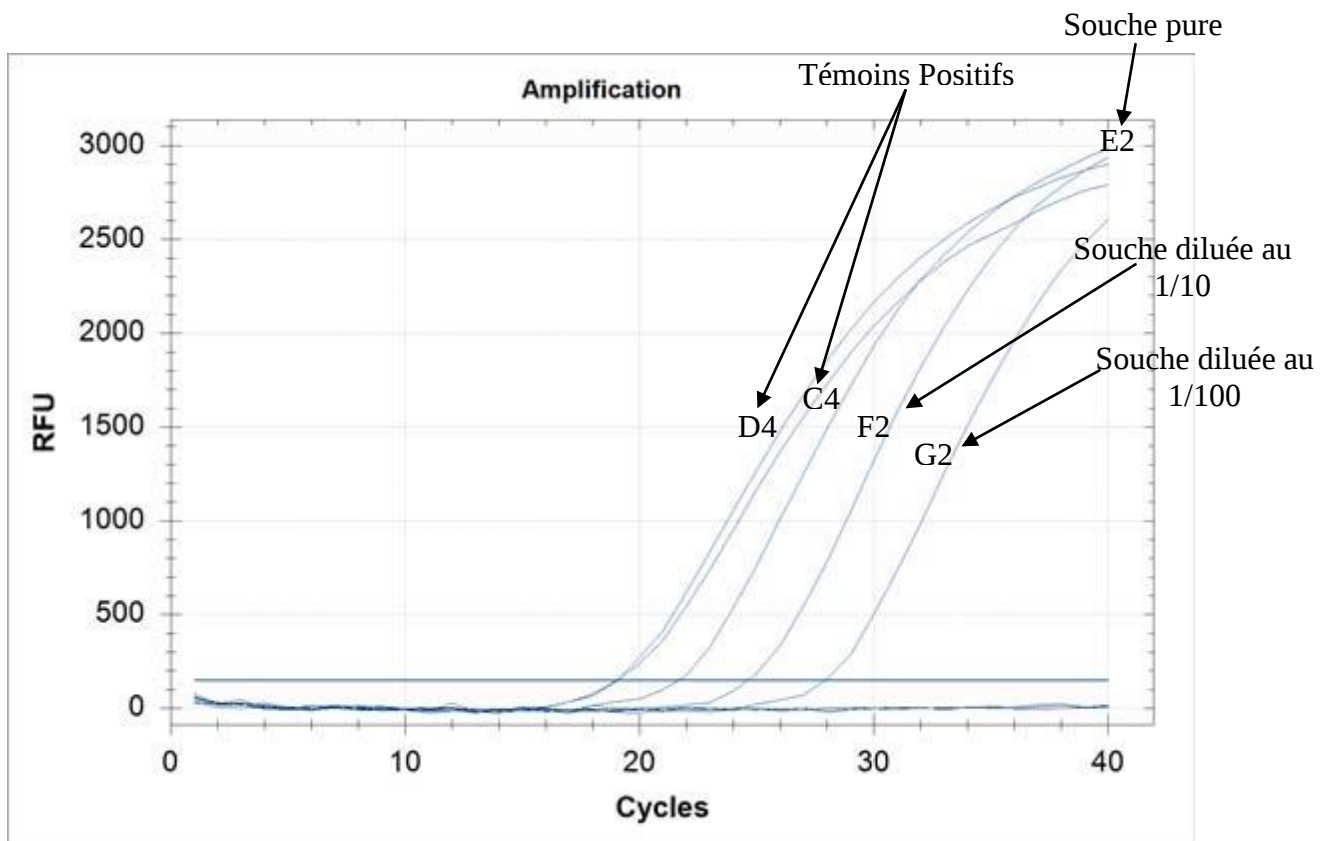


Figure 22 : Résultats de la détection des produits PCR plaque 3 avec les amorces R et S

Croissance des signaux à partir du 20^{ème} cycle. L'échantillon E2 (souche pure) et F2 (dilué au 1/10) a donné un signal plus important comparativement aux sérums témoins positifs comme précédemment avec Sen2 pour G1.

La souche G2 diluée au 1/100 a donné un signal moins important. . Confirmation de l'identité de *Bacillus anthracis*

Les témoins négatifs n'ont pas donné de signal :

En conclusion Il y' a une amplification avec les amorces spécifiques alors que le témoin négatif n'est pas amplifié.

3.3.1.4. Souche N°902 GMB 1 : Les résultats de l'amplification sont interprétés à la suite des différents signaux observés et consignés dans la figure 23 suivante :

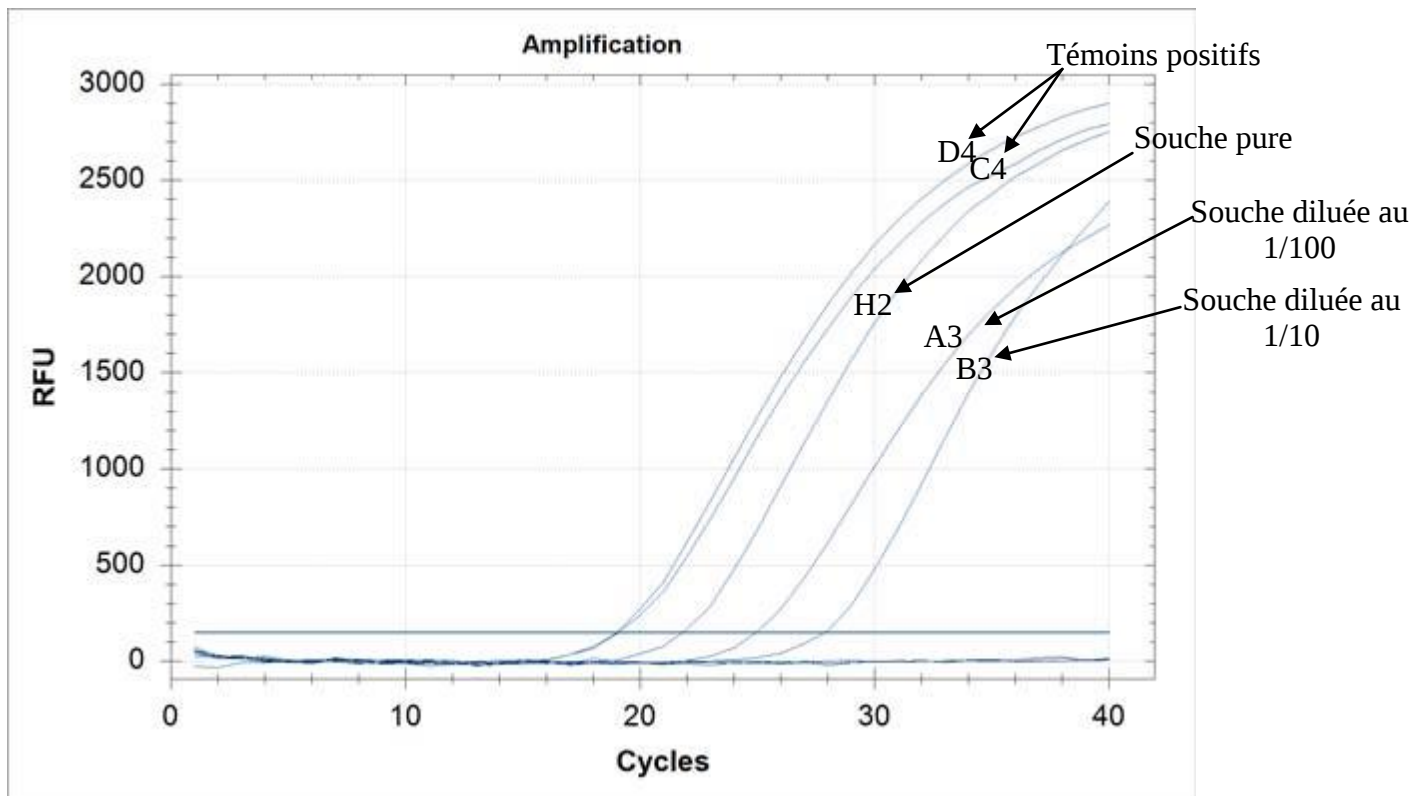


Figure 23 : Résultats de la détection des produits PCR plaque 4 avec les amorces R et S souche gambienne

Les signaux apparaissent à partir de 20 cycles PCR. Les échantillons témoins positifs ont donné des signaux plus importants.

La souche pure (H2) a donné des signaux moins importants que ceux obtenus des témoins positifs de même que les souches diluées au 1/10 et au 1/100.

Les témoins négatifs n'ont pas donné de signal. Le signal obtenu avec la souche Gmb1 (Echantillon N°902 – GMB 1) nous semble légèrement moins important que celui obtenu avec les trois souches Sénégalaises. . Confirmation de l'identité de *Bacillus anthracis*

3.3.2. Microséquençage des souches et analyse génomique

3.3.2.1. Caractéristiques moléculaires des souches

Les résultats sont rapportés dans le tableau IV suivant

Tableau VII: Caractéristiques moléculaires des souches sénégalaises et gambienne de *Bacillus anthracis*.

Souches	Plasmide	Taille		
		(Mb)	GC%	Protéines
<i>Bacillus anthracis</i> souche. Ames	/	5.23	35.4	5,328
<i>Bacillus anthracis</i> souche. CDC 684	pX01, pX02	5.23	35.4	5,579
<i>Bacillus anthracis</i> souche. Sterne	/	5.23	35.4	5,289
<i>Bacillus anthracis</i> souche. 'Ames Ancestor'	pX01, pX02	5.23	35.4	5,208
<i>Bacillus anthracis</i> souche. A0248	pX01, pX02	5.23	35.4	5,041
<i>Bacillus anthracis</i> souche. H9401	BAP1, BAP2	5.22	35.4	5,479
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Sen2Col2 (G192)	pX01, pX02	5.23	35,2	5,487
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Sen3 (G193)	pX01, pX02	5.23		
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Gmb1 (G194)	pX01, pX02	5.23	35,3	5,502
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Sen1 (G195)	/	/	/	/

Les trois souches sénégalaises et la souche gambienne (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 la même teneur moyenne en protéines (environ 5300) de même que les deux plasmides Px01 et Px02 pour

toutes les souches testées à l'exception de la souche Sen1 qui n'a pas été bien lue : la manipulation a été reconfirmée deux fois.

L'alignement MAUVE n'a révélé aucun réarrangement et l'on note une conservation élevée entre tous les génomes .

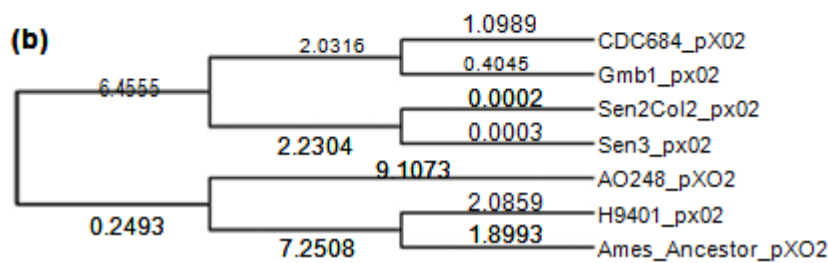
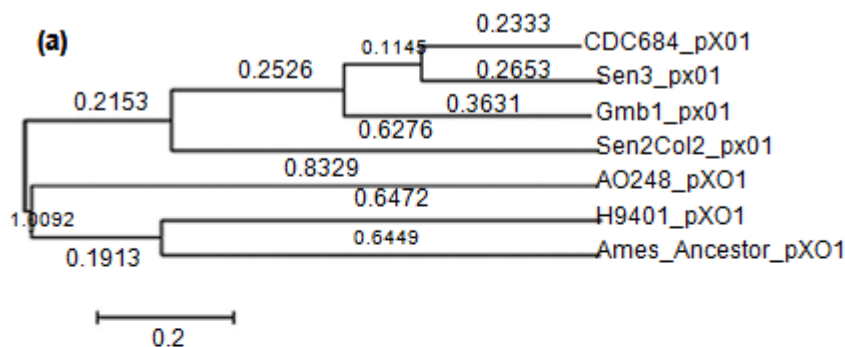
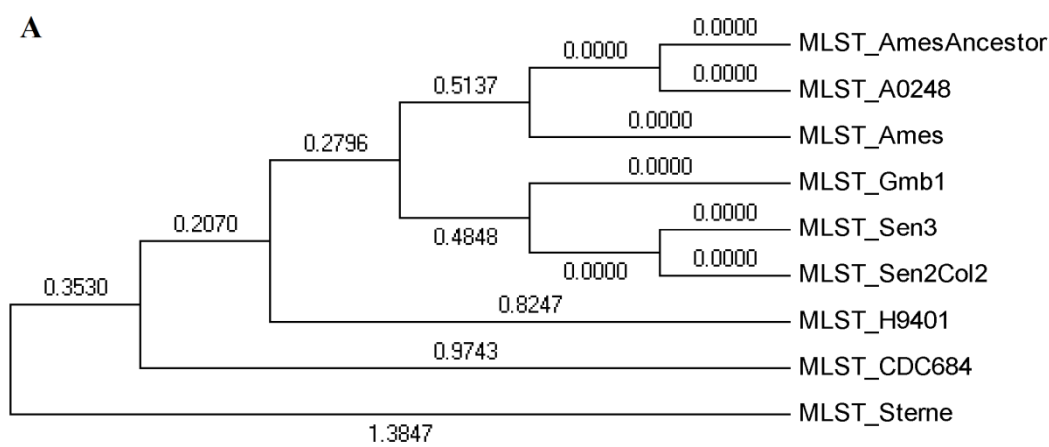
3.3.2.2 – Méthode MAUVE :

L'alignement MAUVE a révélé aucun réarrangement et l'on note un degré de conservation élevée entre tous les génomes. Dans l'ordre, de haut en bas nous avons: la souche de référence A0248, Ames, Ames ancestor, CDC 684, H9401, Sterne, Sen2Col2, Sen3 et Gmb1.

Mauve est un logiciel utilisé pour faire de la génomique comparative. Nous avons utilisé les paramètres par défaut. (Darling AE, *et. ; al.*, 2010;5(6):e11147).

Puis, nous avons regardé les arbres phylogénétiques (figure 24 – B et C).

3.3.2.3. Phylogénie :



r

Fig 24: A/ - Arbre phylogénétique basé sur les MLST (7 gènes de ménage. B/- Basé sur le plasmide pX01. C/- Basé sur le plasmide pX02.

Les faibles valeurs des branches ont montré des similitudes importantes entre les différentes souches sénégalaises et la souche gambienne et les six autres.

Ainsi, sur la base MLST, les souches Ames, Ames Ancêtre et A0248 sont regroupées, les trois souches sénégalaises et la souche gambienne également. En ce qui concerne les plasmides, nous avons trouvé pX01 et pX02 dans nos trois souches, avec la même taille (0,18 Mb et 0,094 Mb), le

même nombre moyen de protéines (195 et 102). Il n'y avait pas de lacunes dans les séquences des plasmides. Sur la base des arbres phylogénétiques (figure 22B et 22C), nous voyons que les deux plasmides des souches sénégalaises et la souche gambienne sont plus proches de ceux de la souche CDC684.

3.3.2.4. Comparaison génomique KEGG et COG

3.3.2.4. 1. Résultats obtenus avec KEGG et PCA

Ils sont rapportés dans la figure 25 suivante :

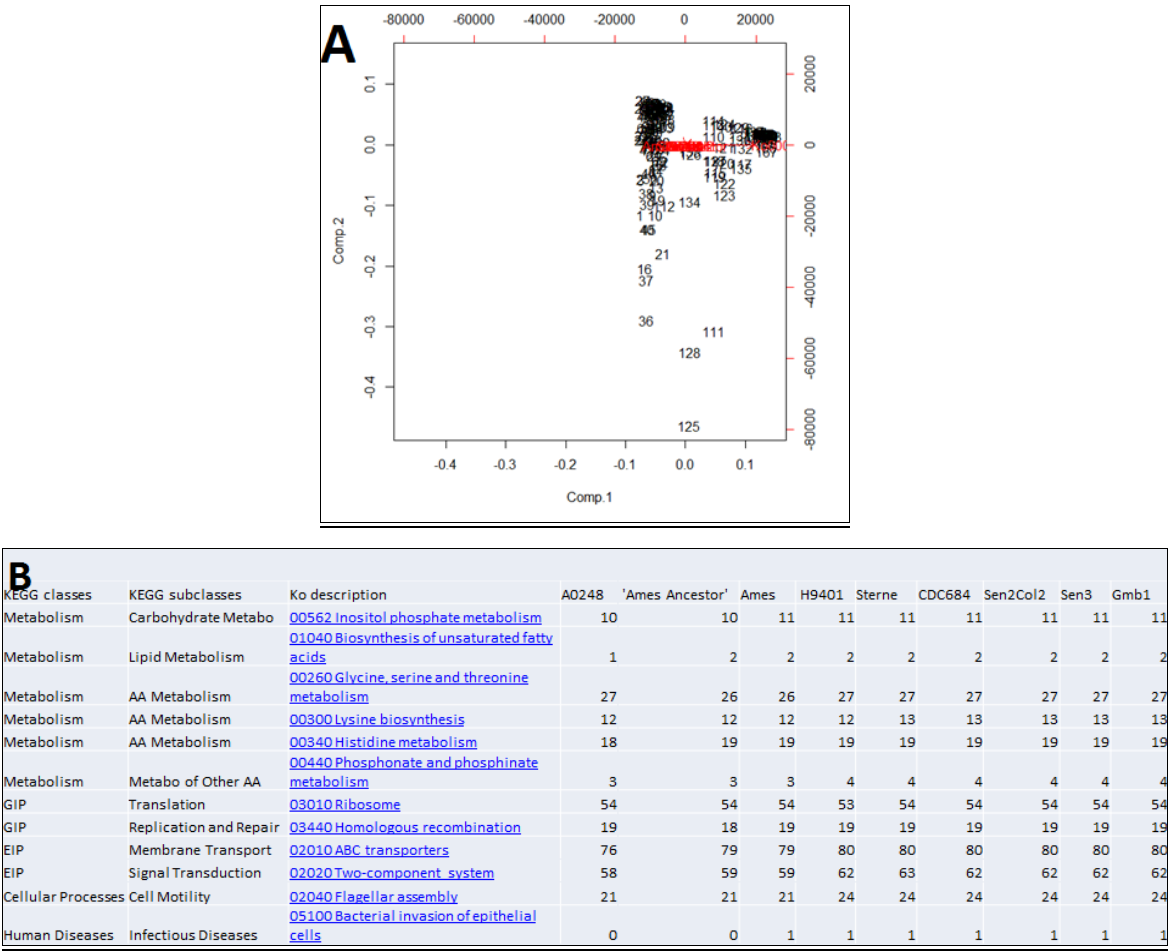


Figure 25: Analyse des résultats obtenus avec KEGG.

A/ Résultats du PCA : Les nombres colorés en noir correspondent au nombre ko. En rouge, nous avons les souches.

B/ Tableau des voies métaboliques où nous avons trouvé quelques différences entre les souches. Ces différences concernent la transduction du signal, le métabolisme de certains acides aminés et

la motilité cellulaire qui sont plus importants pour nos trois souches testées à savoir Sen2, Sen3 et Gmb1 en comparaison du groupe comprenant les souches Ames, Ames Ancêstor et A0248. GIP: genetic information processing, EIP: environmental information processing

3.3.2.4.2. Résultats obtenus avec COG et PCA

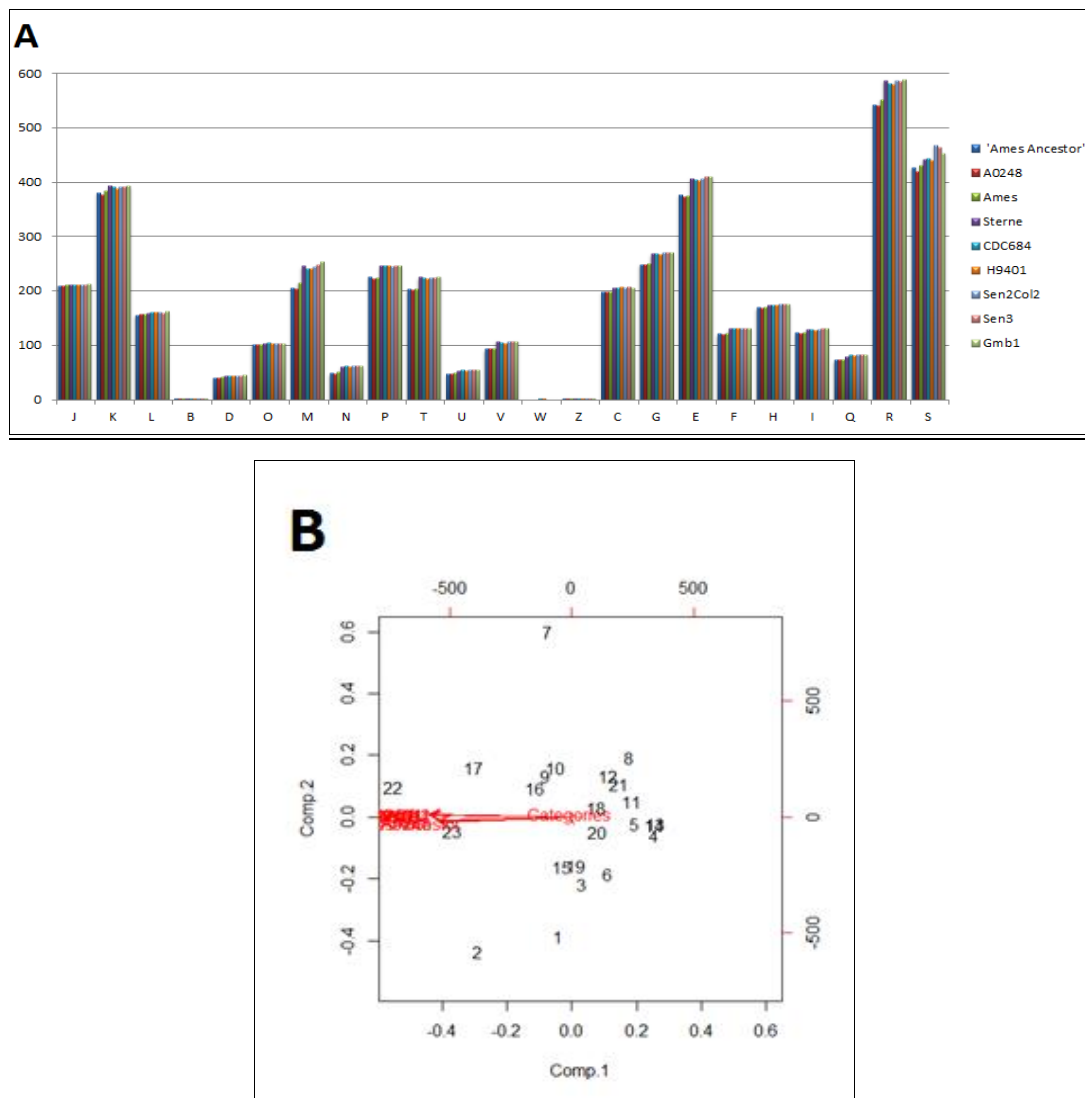


Figure 26: Analyse des résultats du COG. A/ Distribution des différentes catégories de COG parmi les souches. B/ Résultats du PCA. Les nombres en noir correspondent aux catégories du COG. En rouge nous avons les souches.

Les trois souches Sen2, Sen3 et Gmb1, sont dans l'ensemble identiques à CDC684. Elles sont différentes de Sterne (ko02020), deux avec H9401 (ko03010 et ko00300), et d'autres avec Ames (ko00260, ko00300, ko00440, ko02010, ko02020, ko02040), Ames Ancêstor (ko00562, ko00260,

ko00300, ko00440, ko03440, ko2010, ko02020, ko02040, ko05100), A0248 (ko00562, ko01040, ko00300, ko00340, ko00440, ko02010, ko02020, ko02040, ko05100). Les détails sur le nombre ko est fait dans la figure 23B. Ces informations, montrent l'existence de deux groupes: l'un avec A0248, Ames et Ames Ancêtre et le second avec les autres souches.

La figure 26A, correspondant à l'analyse de la composante principale (PCA) réalisée avec les résultats du KEGG, a montré que, malgré quelques différences, toutes les souches étaient très semblables. Il n'y avait pas de différence significative entre pX01 et pX02 des souches sénégalaises est gambienne et celles de la souche A0248, Ames Ancêtre et CDC684 (données non présentées). Nous avons trouvé les mêmes résultats avec le COG. L'ACP (figure 24B), a montré un pool de toutes les souches sur la base de catégories COG et de leur distribution. Dans la figure 24A, les catégories suivantes correspondent aux lettres : E (transport et le métabolisme des acides aminés), G (transport et métabolisme des carbohydrates), P (Transport et métabolisme des composés inorganiques), M (Biogénèse de l'enveloppe et de la membrane cellulaire) : on peut voir cette distribution pour presque toutes les catégories, à l'exception de celles correspondant aux lettres R, S, L, J, B, O, W, Z et I. On peut noter deux groupes distincts, les mêmes trouvés avec KEGG (une avec Ames, Ames ancêtre et A0248, la seconde avec tous les Souches Sen2, Sen3, Gmb1, CDC 684, H9401 et Sterne.

Il n'y avait pas de différence entre le plasmide pX02 des souches sénégalaises et gambienne et celles des trois autres souches. Pour le plasmide pX01, il n'y avait qu'une différence dans la catégorie L (Ames Ancêtre et A0248 avec un léger taux de protéines), Il y'avait quelques petites variations dans les catégories R et S (catégories mal caractérisées).

3.3.2.5 – Etude du pangénome, les SNP et du mobilome

Les résultats sont rapportés dans la figure 25 : Il s'agit d'un pan génome qui est composé de 2893 gènes essentiels (core génome), 7 gènes uniques et 85 gènes accessoires. (Figure 27)

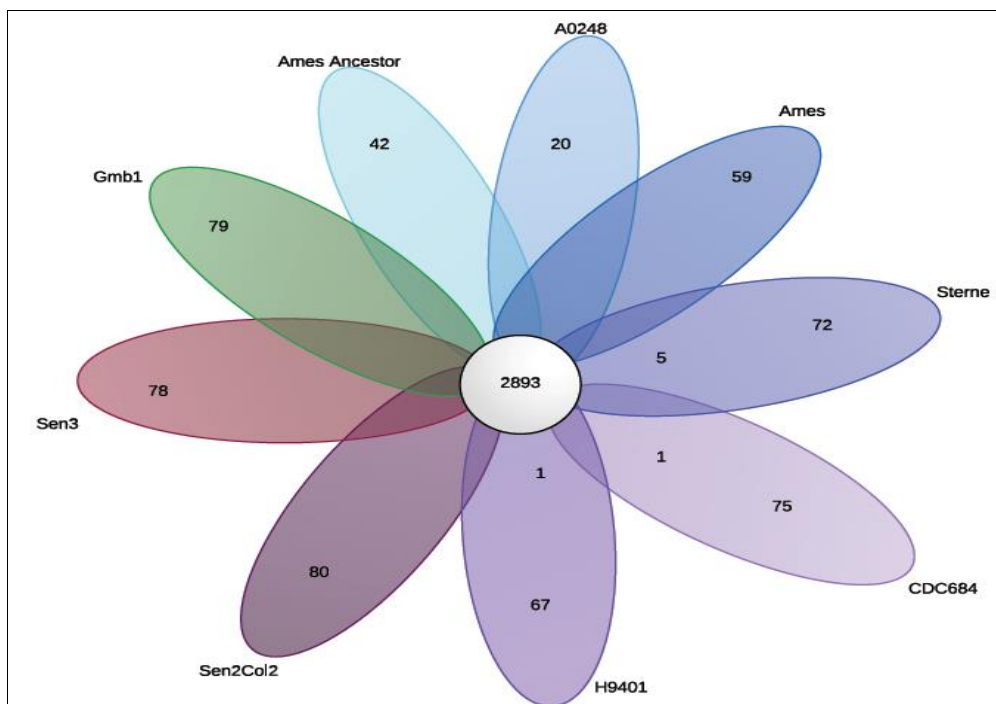


Figure 27: pot de fleurs montrant : le pan - génome de *Bacillus anthracis*.

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).

Le chiffre à la partie inférieure des pétales est le nombre de gènes uniques dans chaque souche.

Ensuite, nous avons examiné en détail les 85 gènes accessoires à partir de la figure suivante montrant bien le clustering hiérarchique (fig 26).

Nous avons examiné le mobilome et constaté la même tendance dans toutes les souches: 2 transposases, 1 ou 2 CRISPRs confirmés et beaucoup de phages ou des protéines / protéines associées aux prophages (123 en moyenne). Nous avons également examiné cette question au niveau des plasmides. Nous avons constaté que tous les plasmides pX01 appartiennent aux transposases 5, 1 et 0 des phages CRISPRs. Tous les plasmides pX02 possèdent 2 transposases, 8 phages et 0 CRISPRs.

Nos trois souches Sen2, Sen3, Gmb1 et CDC 684 accaparent presque tous les gènes accessoires, tandis que la souche A0248 ne renferme seulement que 20 de ces gènes sur les 85. La moitié des gènes accessoires a été considérée comme étant des protéines hypothétiques (Figure 26)

3.3.2.6. Clustering hiérarchique (Laurent C, 2006))



Clustering hiérarchique:

Dans ce Clustering hiérarchique, basé sur les orthologues, on retrouve très distinctement les deux groupes :

Groupe I : Ames – Ames ancestor – A0248 d'un côté

Groupe II : Sen2 – Sen3 – Gmb1 (nos souches) – CDC 684 (USA) – Sterne (IP Paris) de l'autre.

Ce clustering hiérarchique confirme ainsi tous les résultats déjà obtenus sur la base des outils logiciels (COG, KEGG et PCA) et des méthodes utilisées (Mauve et MEGA 5 phylogénie)

Nous avons vu que les souches sénégalaises et gambienne étaient très étroitement liées aux autres souches déjà testées et possédaient un pangénome fermé.

Enfin, nous avons étudié les SNP au niveau du génome de base et avons trouvé 896 SNPs, soit 32% du nombre total de SNP (2786 SNPs trouvé en comparant l'ensemble des génomes), et un rapport de transition / transversion égal à 0,32.

Le très faible taux de SNP et celui du taux bas du rapport transition / transversion associés à la proportion très élevée de la fonction du génome de base comme le pan-génome confirme en plus que la souche de *B.anthraxis* constitue une bactérie ancienne probablement de 150 ans et qui a cessé d'évoluer.

IV. Discussion

4.1. Les produits pathologiques ;

Ils sont constitués de bopsies nécropsiques , de foie, de poumon, de sang. La couleur noire du sang vient confirmer les observations faites par Eusèbe (265 – 304), sur l'apparition de la couleur noire du sang chez les animaux atteints suite à une contamination par la bactériodie charbonneuse.

4.2. Etude bactériologique

L'examen microscopique direct réalisée à partir de culot de broyat d'organe a donné des résultats confirmés par la culture bactériologique. Les études menées à partir des caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques ont donné des résultats conformes à ceux trouvés par Leminor *et al.* (1989) sur les critères d'identification de *Bacillus anthracis*.

L'étude du pouvoir pathogène expérimental, des souris ayant reçu chacune une suspension des souches bactériennes a entraîné leur mort 6 heures après l'inoculation ce qui confirme les observations faites sur l'effet léthal (effet du facteur léthal ou facteur III en associée avec le facteur I ou facteur oedématogène) de *Bacillus anthracis* chez la souris. par Leminor *et al.* 1989

Toutes les souches testées (sen1, Sen2, Sen3 et Gmb1) ont poussé sur gélose au sang de mouton à + 37°C. Elles ont donné des colonies légèrement hémolytiques et étaient catalase positive et immobiles à Gram positif . La présence de la capsule a été confirmée par cette méthode classique. La présence de spores associée à celle de la capsule et de spores nondéforantes. Les quatre souches de *Bacillus anthracis* évaluées pour cette étude bactériologique, peuvent être considérées comme virulentes car ayant montré la présence des deux plasmides PX01 et PX02.

Les techniques bactériologiques basées sur la culture de la souche pour l'identification de *Bacillus anthracis* sont des méthodes manuelles qui peuvent prendre beaucoup de temps pour leur exécution, d'où l'utilité de recourir à des méthodes de détection plus rapides comme la PCR en temps réel avec détecteur lumineux qui nous a donné les résultats très sensibles et qui ont confirmé ceux de la méthode classique.

4.3. Etude moléculaire . Ce test PCR a bien détecté le gène *Pag a* dans les quatre souches testées. Nous pouvons dire que les amorces oligonucléotidiques pour PCR ont bien amplifié l'ADN de nos quatre souches, et que ces souches sont bien identifiées comme étant *B. anthracis*.

Les ADN contrôle positifs pour *pag a* sont des constructions plasmidiques contenant une partie de ces gènes cibles.

Cette méthode PCR d'amplification des acides nucléiques a été 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 (Cockerill *et al.*, 2001).

Tous ces résultats obtenus, confirment l'hypothèse selon laquelle, les laboratoires qui se limitent uniquement à la culture conventionnelle basée sur les techniques classiques peuvent fausser le résultat du diagnostic de l'anthrax : Ce qui n'est pas le cas pour la technique moléculaire comme PCR en temps réel Il est à noter que le criblage des séquences chromosomiques d'acides nucléiques pour l'identification de *Bacillus anthracis* est fortement déconseillé à raison de la grande homologie de séquences chromosomiques existant entre les micro organismes du génogroupe *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* et *Bacillus thuringiensis* qui peuvent même appartenir à la même espèce (Helgason *et al.*, 2000). C'est la raison pour laquelle le gène *Pag a*, porté par le plasmide pX01 a été choisi pour l'identification moléculaire (Ellerbrok *et al.*, 2002).

Les résultats de la PCR en temps réel avec le Kit light cycler , ne sont pas en contradiction avec ceux trouvés par Keim *et al.*, (2000) dans le cadre de leurs recherches moléculaires sur des souches de *Bacillus anthracis* dans certaines régions du monde (Asie, Australie, Europe, Amérique du Nord , Amérique du Sud et dans des pays de l'Afrique du Sud).

Les techniques moléculaires concernant la médecine humaine, sont à l'heure actuelle surtout utilisées dans certains pays en développement comme la Guinée Bissau ou l'Ethiopie où des chercheurs ont pu différencier avec succès des souches bactériennes en combinant des tests biochimiques avec le RFLP (Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction) (Ayele *et al.*, 2004).

Cependant d'autres méthodes méritent d'être utilisées pour un meilleur diagnostic de l'anthrax dont celles menées par Ogawa H *et al.*, 2015 concernant la PCR multiplex, une technique nouvellement développée, très sensible et qui constitue une méthode pratique pour l'identification moléculaire de *Bacillus anthracis* (Ogawa H *et al.*, 2015) à partir d'écouvillons nasaux ou à partir du sang suspect.

Les Etats africains gagneraient plus à investir dans l'utilisation des nouvelles techniques de biologie moléculaire afin d'identifier de manière sûre les différentes souches bactériennes de *Bacillus anthracis*. Une identification rapide des différents types de bacilles chez les bovins pourrait contribuer à une meilleure connaissance de l'anthrax et permettre une lutte plus efficace contre cette maladie d'intérêt vétérinaire et humain.

4.4. Analyse génomique

Pour cette étude, nous avons utilisé six souches déjà séquencées (Ames, Ames Ancestor, Sterne, A0248, H9401 et CDC684) ayant un génome complet, et trois de nos souches (Sen2Col2, Sen3 et Gmb1). Afin de nous assurer de la pertinence de nos résultats, nous avons fait appel à trois différents outils (COG – analyse fonctionnelle, KEGG – analyse métabolique, PCA – analyse statistique) mais à deux différentes méthodes : celle d'alignement (MAUVE), et de l'étude de la phylogénie et de la définition des orthologues (OrthoMCL, MeV).

Les trois nouvelles souches sénégalaises et gambienne ont toutes la même taille, la même valeur du GC% et le même nombre moyen de protéines que les autres souches de référence. En plus elles renferment chacune les deux plasmides PX01 et PX02. La présence de ces plasmides confirme bien la nature virulente de ces isolats telle que énoncée par Stanley et Schmidt (Stanley et Schmidt., 1961).

L'arbre phylogénétique construit à partir de nos résultats sur la base des MLST est comparable à celui obtenu par Keim *et al.*, (2000) où deux sous groupes distincts ont été notés : Ces groupes 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 corrobore les observations faites par Keim *et al.*, (2000) à partir de résultats obtenus concernant l'étude de la biodiversité de souches de *Bacillus anthracis* dans certaines régions du monde.

Nous avons remarqué que la souche Ames ancêtre renfermait 42 gènes accessoires, tandis que sa version non virulente, Ames en possédait 59. De plus, nous avons fait le rapport noyau / pan-génome et nous avons trouvé que le génome de base représentait 99% du pan-génome

L'addition des trois souches sénégalaises et gambienne 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*. (tableau) Biblio

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* dérivé 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.anthraxis* 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. Nous avons constaté que les SNPs sont au nombre total de 2786, dont 896 sont logés dans le génome de base. En outre, le rapport de transition / transversion est très faible (0,32).

Ce manque de SNP peut valider notre hypothèse sur l'arrêt de l'évolution de cette espèce. *B.anthraxis* qui est une souche ancienne qui s'est stabilisée avec le temps et qui présente un pan-génome de type étroit.

Il est à noter une différence légèrement significative entre le génome des souches sénégalaises et gambienne et certaines souches de référence dont la A0248., la souche Ames ancestor, virulente disposant de ses deux plasmides et la souche Ames, non virulente ayant perdu ses deux plasmides.

V. CONCLUSION GENERALE

Ces résultats importants nous permettent d'apporter les affirmations suivantes à savoir :

Que cette étude génomique comparative nous permet de montrer une très forte similarité au sein des souches de *B.anthraxis* Sen2, Sen3 et Gmb1 ce qui pourrait contribuer à la mise au point d'une souche vaccinale recombinante commune dans les deux pays ciblés.

B.anthraxis découvert il y'a 150 ans a gardé le même contenu génomique. Comme dit dans la littérature, on retrouve les caractéristiques spécifiques d'un pan - génome étroit et fermé ce qui vient corroborer les observations faites par Tettlin *et al.*, (2005) sur l'étude d'un pan - génome obtenu à partir de l'analyse de génome d'isolats de souches de *Streptococcus agalactiae* (Tettlin *et al.*, 2005).

Nous sommes dans le cas d'un pan- génome très fermé avec une espèce qui ne vit pas dans l'environnement.

Les résultats obtenus dans le cadre du présent travail incitent à une poursuite des recherches pour la mise au point d'un vaccin recombinant. Cette souche utilisée à partir d'un vecteur d'expression indiqué soit *Escherichia coli* ou le *Baculovirus* pourrait permettre la mise au point d'une souche vaccinale recombinante protégeant contre la maladie charbonneuse des ruminants.

Les études moléculaires ont montré une similarité des génomes des trois souches de *Bacillus anthracis* (absence de variabilité génomique significative) ; donc une possibilité de fabrication d'un vaccin anticonventionnel et ses avantages par rapport aux vaccins classiques sont réels à savoir une protection à 100% des animaux après une vaccination qui est unique, une réduction substantielle des intrants nécessaires à l'activité production donc économique.

Cette souche vaccinale ainsi obtenue sera caractérisée et soumise à un contrôle de la qualité (stabilité, innocuité, efficacité) et sera par la suite utilisée pour une production de vaccin recombinant qui sera évalué en station d'abord, en milieu réel ensuite, avant d'avoir l'autorisation d'une production commerciale

Références Bibliographiques

REFERENCES

1. **Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H., and van der Goot, F. G. (2003).** Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol* **160**, 321-328.
2. **Abrami, L., Lindsay, M., Parton, R. G., Leppla, S. H., and van der Goot, F. G. (2004).** Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol* **166**, 645-651.
3. **Abrami, L., Reig, N., and van der Goot, F. G. (2005).** Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* **13**, 72-78.
4. **AFSSAPS (2005).** Charbon, thérapeutique. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé <http://agmed.sante.gouv.fr>.
5. **Agrawal, A., Lingappa, J., Leppla, S.H., Agrawal, S., Jabbar, A., Quinn,C., and Pulendran, B. (2003)** – Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* **424**, 329 – 334.
6. **Alam, S., Gupta, M., and Bhatnagar, R. (2006).** Inhibition of platelet aggregation by anthrax edema toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 107-114.
7. **Aloni-Grinstein, R., Gat, O., Altboum, Z., Velan, B., Cohen, S., and Shafferman, A. (2005).** Oral spore vaccine based on live attenuated Non toxinogenic *Bacillus anthracis* expressing recombinant mutant protective antigen. *Infect Immun* **73**, 4043-4053.
8. **Arora, N., Leppla, S. H. (1993).** Residues 1254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. *J Biol Chem* **268**, 3334-3341.

9. **Ashiuchi, M., Nawa, C., Kamei, T., Song, J. J., Hong, S. P., Sung, M. H., Soda, K., and Misono, H. (2001).** Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **268**, 5321-5328.

10. **Ayele W.Y., Neill S.D., Pavlik I., Zinsstag J. et Weiss M.G., -(2004).** Bovine tuberculosis : an old disease but a new threat to Africa. *Int Journal of tuberculosis and lung dis* **8** (8): 924 - 937

11. **Aziz, R. K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. et.al. (2008).** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC.Genomics* 9:75.

12. **Baldari, C. T., Tonello, F., Paccani, S. R., and Montecucco, C. (2006).** Anthrax toxins: a paradigm of bacterial immune suppression. *Trends Immunol.* 20 – 28.

13. **Banks, D. J., Ward, S. C., and Bradley, K. A. (2006).** New insights into the functions of anthrax toxin. *Expert Rev Mol Med* **8**, 1-18.

14. **Barakat LA Quentzel HL, le juge Jernigan, et al. (2002)** Le charbon mortel par inhalation dans un 94-year-old woman Connecticut JAMA 2002; 287:... 863-868 [*. PubMed*]

15. **Bartlett, J. G., Inglesby, T. V., Jr., and Borio, L. (2002).** Management of anthrax. *Clin Infect Dis* **35**, 851-858

16. **Beall, F. A., Taylor, M. J., and Thorne, C. B. (1962).** Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **83**, 1274 - 1280.

17. **Bengio, Y et al. (2013).** "Representation Learning: A Review and New Perspectives" (PDF). *Pattern Analysis and Machine Intelligence* **35** (8).

18. **Bonuccelli, G., Sotgia, F., Frank, P. G., Williams, T. M., de Almeida, et.al (2005).** ATR/TEM8 is highly expressed in epithelial cells lining *Bacillus anthracis* three sites of entry: implications for the pathogenesis of anthrax infection. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1402-1410.
19. **Borio, L., Frank, D., Mani, V., Chiriboga, C., Pollanen, M., Ripple, M., Ali, S., DiAngelo, C., Lee, J., Arden, J., et al. (2001).** Death due to bioterrorism-related inhalational anthrax: report of 2 patients. *Jama* **286**, 2554-2559.
- 20 **Bradley, K. A., and Young, J. A. (2003).** Anthrax toxin receptor proteins. *Biochem Pharmacol* **65**, 309-314.
- 21 **Bragg, T. S., and Robertson, D. L. (1989).** Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene* **81**, 45-54.
- 22.**Broome, S., Gilbert, W. – (1978.)** Immunological screening method to detect specific translation products. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* : **75** : 2746 – 2749.
23. **Brossier, F., and Mock, M. (2001).** Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon* **39**, 1747-1755.
- 24**Brossier, F., Levy, M., and Mock, M. (2002).** Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect Immun* **70**, 661-664.
25. **Brossier, F., Levy, M., Landier, A., Lafaye, P., and Mock, M. (2004).** Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect Immun* **72**, 6313-6317.
- 26 **Candela, T., Mock, M., and Fouet, A. (2005).** CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *J Bacteriol* **187**,765-772.

27. **Candela, T., and Fouet, A. (2006).** Poly-gammaglutamate in bacteria. *Mol Microbiol* **60**, 1091- 1098.

28. **CDC (2002).** From the Centers for Disease Control and Prevention. Additional option for preventive treatment for exposed persons to inhalational anthrax. *Jama* **287**, 579

29. **Chamberland, C. (1883).** Le charbon et la vaccination charbonneuse. (Paris, Bernard Tignol).

30. **Chen F, Mackey AJ, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS (2006)** OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. *Nucleic Acids Res* **34**:D363-D368.

31. **Chopra, A. P., Boone, S. A., Liang, X., and Duesbery, N. S. (2003).** Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J Biol Chem* **278**, 9402-9406.

32. **Christie G, Gotzke H, Lowe CR (2010).** *Identification of a receptor subunit and putative ligand-binding residues involved in the Bacillus megaterium QM B1551 spore germination response to glucose. J. Bacteriol.* 192:4317–4326.

33. **Chun JH, et al. (2012)** - Complete genome sequence of *Bacillus anthracis* H9401, an isolate from a Korean patient with anthrax. *J Bacteriol* 2012 Aug. 3217 – 3224

34. **Claus, D., and Berkeley, R. C. W. (1980).** *Genus Bacillus* Cohn 1872. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1105-1139.

35. **Cockerill, F R and J R Uhl – (2001)** Applications and challenge of real time PCR for the clinical microbiology Laboratory, in Reischl C Witter and Fr Cockerill (ed) Rapid cycle real time PCR, methods and applications microbiology and food analysis. *Springer, Berlin, Germany*. P 31 – 41

36. **Comer, J. E., Chopra, A. K., Peterson, J. W., and Konig, R. (2005a).** Direct inhibition of T-lymphocyte activation by anthrax toxins in vivo. *Infect Immun* **73**, 8275-8281.
37. **Comer, J. E., Galindo, C. L., Chopra, A. K., and Peterson, J. W. (2005b).** Gene Chip analyses of global transcriptional responses of murine macrophages to the lethal toxin of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **73**, 1879-1885.
38. **Constance, A et .al., (2002)** – Detection of *Bacillus anthracis* DNA by light cycler PCR, J. Clin.Microbiol 40 (8) : 2897 – 2902
39. **Crawford, M. A., Aylott, C. V., Bourdeau, R. W., and Bokoch, G. M. (2006).** *Bacillus anthracis* toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity. *J Immunol* **176**, 7557-7565.
40. **Cui, X., Moayeri, M., Li, Y., Li, X., Haley, M., Fitz, Y.,et.al. (2004).** Lethality during continuous anthrax lethal toxin infusion is associated with circulatory shock but not inflammatory cytokine or nitric oxide release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R699-709.
- 41 **Dal Molin, F., Tonello, F., Ladant, D., Zorretta, I., Zamparo, I., Di Benedetto, G. Zaccolo, M., and Montecucco, C. (2006).** Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *Embo J* **25**, 5405-5413.
42. **Dang, O., Navarro, L., Anderson, K., and David, M. (2004).** Cutting edge: anthrax lethal toxin inhibits activation of IFN-regulatory factor 3 by lipopolysaccharide *J Immunol* **172**, 747-751.
43. **Darling AE, Mau B, Perna NT (2010)** progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* **5**: e11147. 10.1371/journal.pone.
44. **Dixon, T. C., Meselson, M., Guillemin, J., and Hanna, P. C. (1999).** Anthrax. *N Engl J Med* **341**, 815-826.

45. **Doganay M, Metan G, Alp E.** (2010) Un examen de l'anthrax cutané et son résultat *J Infect*; 3:... 98-105 *PubMed*]
46. **Dong, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2002).** MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**, 55-72.
- 47 **Drum, C. L., Yan, S. Z., Bard, J., Shen, Y. Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., and Tang, W. J. (2002).** Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* **415**, 396-402.
48. **Duesbery, N. S., Webb, C. P., Leppla, S. H., Gordon, V. M., Klimpel, K et.al.. (1998).** Proteolytic inactivation of MAP-kinasekinase by anthrax lethal factor. *Science* **280**, 734-737.
49. **.Duric P, Cosic G, Rajcevic S, et al. . (2011)-** Trois cas probables de charbon cutané dans la province autonome de Voïvodine, en Serbie,. *Euro Surveill* 2012; 17: 4-6. [*. PubMed*]
50. **During, R. L., Li, W., Hao, B., Koenig, J. M., Stephens, D. S. et.al. (2005).** Anthrax lethal toxin paralyzes neutrophil actin-based motility. *J Infect Dis* **192**, 837-845
- 51 **Ellerbrok, H, Nattermann, H., Ozel, M., Bartin, L., Appel, B., Paul, G., (2002).** Rapid sensitive identification of pathogenic and antipathogenic *B. anthracis* by real time PCR. *FEMS.Microbiol* : 214 ; 51 - 59
52. **Enstone, J. E., Wale, M. C., Nguyen-Van-Tam, J. S., and Pearson, J. C. (2003).** Adverse medical events in British service personnel following anthrax vaccination. *Vaccine* **21**, 1348-1354.
53. **Erwin, J. L., DaSilva, L. M., Bavari, S., Little, S. F., Friedlander, A. M., and Chanh, T. C. (2001).** Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect Immun* **69**, 1175- 1177.

54. **Escuyer, V., Duflot, E., Sezer, O., Danchin, A., and Mock, M. (1988).** Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene* **71**, 293- 298.

55. **Eveland, S. S., Pompliano, D. L., and Anderson, M. S. (1997).** Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and folyl poly-gamma-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily. *Biochemistry* **36**, 6223- 6229

56. **Fang, H., Cordoba-Rodriguez, R., Lankford, C. S., and Frucht, D. M. (2005).** Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4+ T cells. *J Immunol* **174**, 4966-4971.

57. **Fang, H., Xu, L., Chen, T. Y., Cyr, J. M., and Frucht, D. M. (2006).** Anthrax lethal toxin has direct and potent inhibitory effects on B cell proliferation and immunoglobulin production. *J Immunol* **176**, 6155-6161.

58. **Fellows, P. F., Linscott, M. K., Ivins, B. E., Pitt, M. L., Rossi, C. A., et.al. (2001).** Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine* **19**, 3241-3247.

59. **Fink B, Landthaler M, C. Hafner (2011) -** Journal der Deutschen Gesellschaft Dermatologischen 2011; 9:. 633-640 [*PubMed*]

60. **Firoved, A. M., Miller, G. F., Moayeri, M., Kakkar, R., Shen, Y et.al. (2005).** *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Am J Pathol* **167**, 1309-1320.

61. **Fish, D., Mahlandi, B.G., Dobbs, J.P., Lincoln, R.E. – (1968).** Purification and properties of in vitro produced anthrax toxin components. *J. Bacteriol*, **95** : 907 – 918 IST (1969).

62. **Fouet, A., and Mock, M. (1996).** Differential influence of the two *Bacillus anthracis* plasmid on regulation of virulence gene expression. *Infect Immun* **64**, 4928 - 4932.

63. **Fouet, A., and Mock, M. (2006).** Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. *Curr Opin Microbiol* **9**, 1-7.
64. **Friedlander, A. M. (1986).** Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid dependent process. *J Biol Chem* **261**, 7123- 7126.
65. **Friedlander, A. M., Bhatnagar, R., Leppla, S. H., Johnson, L., and Singh, Y. (1993).** Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. *Infect Immun* **61**, 245-252.
66. **Friedlander, A. M., Welkos, S. L., and Ivins, B. E. (2002).** Anthrax vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* **271**, 33-60.
67. **Ghossain, A. (2006).** Images in clinical medicine. Anthrax of the caecum. *N Engl J Med* **355**, 940 - 945.
68. **Gimenez, A. P., Wu, Y. Z., Paya, M., Delclaux, C., Touqui, L., and Goossens, P. L. (2004).** High bactericidal efficiency of type IIa phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *J Immunol* **173**, 521-530.
69. **Gladstone, G. P. (1946).** Immunity to anthrax: protective antigen present in cell- free culture filtrates. *Br J Exp Pathol* **27**, 394 - 418.
70. **Goodman, J. W., and Nitecki, D. E. (1967).** Studies on the relation of a prior immune response to immunogenicity. *Immunology* **13**, 577-583.
71. **Grissa, I., G. Vergnaud, and C. Pourcel. (2007).** CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* **35**:W52-W57
72. **Grunow R, Grunow D, Schaade L.** Anthrax - serologische Untersuchung zur Fallfindung von (2012) *Bacillus anthracis*-bei-Expositionen Heroinkonsumenten in Deutschland im Période de 2010 à 2011 Institut Robert Koch: *Bulletin Epidemiologisches* Nr 26...

- 73.. **Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Mock, M., and Cabiaux, V. (2000).** Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cell Microbiol* **2**, 259 - 264.
74. **Hambleton, P., Carman, J. A., and Melling, J. (1984).** Anthrax: the disease in relation to vaccines. *Vaccine* **2**, 125-132.
75. **Hambleton, P., and Turnbull, P. C. (1990).** Anthrax vaccine development: a continuing story. *Adv Biotechnol Processes* **13**, 105-122.
76. **Hanby, W. E., and Rydon, H. N. (1946).** The capsular substance of *Bacillus anthracis*. *Biochem J* **40**, 297-307.
- 77.. **Equipe de contrôle. Scotland protection de la santé.(2011).** Une épidémie de la maladie du charbon chez les usagers de drogues en Ecosse, Décembre 2009 à Décembre 2010. Glasgow *Health Protection Scotland*; pp. 1–117.
78. **Helgason,EOA., Okstad D A, Cangant H A, Johansen, A, Fouet, M, Mock, et.al.I, Hegn and AB Kolsto – (2000)** *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol* **66** : 2627 – 2630.
- 79.Holzmann T, Frangoulidis D, Simon M, et al. (2012) - Infection mortelle de l'anthrax chez un usager d'héroïne dans le sud de l'Allemagne, . Euro Surveill . 17 [PubMed]
80. **Hong, J., Beeler, J., Zhukovskaya, N. L., He, W., Tang, W. J., and Rosner, M. R. (2005).** Anthrax edema factor potency depends on mod of cell entry. *Biochem Biophys Res Commun* **335**, 850-857.
81. **Hsu, L. C., Park, J. M., Zhang, K., Luo, J. L., Maeda, S., et.al. (2004).** The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* **428**, 341-345.

82. **Inglesby, T.V, Henderson, DA., Barlett, JG., Ascher, MS., Eitzen, E., et.al. (1999)** – Anthrax a biological weapon medical and public health management working group on civilian *biodefense jama*; 281 (18), 1735 – 45.
83. **Inglesby, T. V., O'Toole, T., Henderson, D. A., Bartlett, J. G.,et al. (2002).** Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *Jama* 287, 2236-2252.
84. **Ivins, B. E., Pitt, M. L., Fellows, P. F., Farchaus, J. W., Benner, G. E.,et.al. (1998).** Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Vaccine* 16, 1141-1148.
- 85 **Jernigan, J. A., Stephens, D. S., Ashford, D. A., Omenaca, C., et al. (2001).** Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerg Infect Dis* 7, 933-944.
86. Kanehisa,M -, 2000 - Nucleic acids research Oxford Univ Press
87. **Kassam, A., Der, S. D., and Mogridge, J. (2005).** Differentiation of monocytic cell lines confers susceptibility to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Cell Microbiol* 7, 281-292.
88. **Kau, J. H., Sun, D. S., Tsai, W. J., Shyu, H. F., Huang, H. H., Lin, et.al. (2005).** Antiplatelet activities of anthrax lethal toxin are associated with suppressed p42/44 and p38 mitogen-activatedprotein kinase pathways in the platelets. *J Infect Dis* 192, 1465-1474.
89. **Kaufmann, A. F., and Dannenberg, A. L. (2002).** Age as a risk factor for cutaneous human anthrax: evidence from Haiti, 1973-1974. *Emerg Infect Dis* 8, 874- 875.
90. **Keim, P., Kalif, J.M. ; Schipp, K.K. ; Hill, S.E ; Travis, K. Richmond, et.al, (1997)** - Molecular evolution and in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment lenght polymorphism markers. *J. Bacteriol*, 1997, 179, 818 – 824

91. **Keim. P, .Price L.B., Amkleyvytska, Smith. K.L, Schupp. J M, Okinaka.R, et.al (2000)** – Multiple – Locus Variable – Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic relationship within *Bacillus anthracis* *J.Bacteriol.*2000, **182** (10) : 2928 .. DOI.10.1128/JB.182.10.2928 – 2936.2000
92. **Kelley, J. (1990).** Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* **141**, 765-788.
- 93 . **Keppie, J., Smith, H., and Harris-Smith, P. W. (1955).** The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. III. The role of the terminal bacteraemia in death of guinea-pigs from anthrax. *Br J Exp Pathol* **36**, 315- 322.
94. **Kim, S. O., Jing, Q., Hoebe, K., Beutler, B., Duesbery, N. S., and Han, J. (2003).**Sensitizing anthrax lethal toxin-resistant macrophages to lethal toxin induced killin by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **278**, 7413-7421.
95. **Kim, K., E. Cheon, K. E. Wheeler, Y. Youn, T. J. Leighton, et.al.,(2005).** Determination of the most closely related *Bacillus* isolates to *Bacillus anthracis* by multilocus sequence typing. *Yale J.Biol.Med.* **78**:1-14.
96. **Kirby, J. E. (2004).** Anthrax lethal toxin induces human endothelial cell apoptosis. *Infect Immun* **72**, 430-439.
97. **Klimpel, K. R., Molloy, S. S., Thomas, G., and Leppla, S. H. (1992).** Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10277-10281.
98. **Klimpel, K. R., Arora, N., and Leppla, S. H. (1994).** Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol* **13**, 1093-1100.
99. **Koch, R. (1876).** Untersuchungen über Bakterien. Die Etiologie der Milzbran-Krankheit gegründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. . *Beitr Biol Pflanz* **2**, 277-310.

100. **Kochi, S. K., Schiavo, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1994).** Zinc content of the *Bacillus anthracis* lethal factor. *FEMS Microbiol Lett* **124**, 343-348.
101. **Kolbe, A., Yuen, M. G., and Doyle, B. K. (2006).** A case of human cutaneous anthrax. *Med J Aust* **185**, 281-282.
102. **Krantz, B. A., Trivedi, A. D., Cunningham, K., Christensen, K. A., and Collier, R. J. (2004).** Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin. *J Mol Biol* **344**, 739-756.
103. **Krantz, B. A., Finkelstein, A., and Collier, R. J. (2006).** Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J Mol Biol* **355**, 968 - 979.
104. **Labruyere, E., Mock, M., Ladant, D., Michelson, S., Gilles, A. M., Laoide, B., and Barzu, O. (1990).** Characterization of ATP and calmodulin-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. *Biochemistry* **29**, 4922-4928.
105. **Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C., and Collier, R. J. (2004a).** Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13147-13151.
106. **Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A., and Collier, R. (2004b).** Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of Human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6367-6372.
107. **Laurent C, (2006)** – Contextualisation, visualisation et évaluation en apprentissage – Thèse – Univ – Lille – 09/15, 250pp
108. **L. Leminor, (1989)** – Bactériologie médicale – 2ème Edition
109. **Leppla, S. H. (1982).** Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad. Sci U S A* **79**, 3162-3166.

110. **Leppia, S. H. (1984).** *Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **17**, 189-198.
111. **Lindeque, P. M., and Turnbull, P. C. (1994).** Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. *Onderstepoort J Vet Res* **61**, 71-83.
112. **Little, S. F., and Lowe, J. R. (1991).** Location of receptor-binding region of protective antigen from *Bacillus anthracis*. *Biochem Biophys Res Commun* **180**, 531-537.
113. **Little, S. F., Ivins, B. E., Fellows, P. F., and Friedlander, A. M. (1997).** Passive protection by polyclonal antibodies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs. *Infect Immun* **65**, 5171 - 5175.
114. **Lu, Q., Wei, W., Kowalski, P. E., Chang, A. C., and Cohen, S. N. (2004).** EST based genome-wide gene inactivation identifies ARAP3 as a host protein affecting cellular susceptibility to anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17246-17251.
115. **Makino, S., Watarai, M., Cheun, H. I., Shirahata, T., and Uchida, I. (2002).** Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *J Infect Dis* **186**, 227-233.
116. **Maldonado-Arocho, F. J., Fulcher, J. A., Lee, B., and Bradley, K. A. (2006).** Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte- derived cells. *Mol Microbiol* **61**, 324-337.
117. **M.C. . Maiden et al, 1998 ; Urwin et al.,(2003)** Multilocus Sequence Typing: une approche portable à l'identification de clones au sein des populations de micro-organismes pathogènes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3140-3145.

118. **Maurer, P. H. (1965).** Antigenicity of Polypeptides (Poly Alpha Amino Acids).13.Immunological Studies with Synthetic Polymers Containing Only D-or and L-Alpha-Amino Acids. *J Exp Med* **121**, 339-349.

119. **Mayer, T. A., Bersoff-Matcha, S., Murphy, C., Earls, J.,et.al., (2001).** Clinical presentation of inhalational anthrax following bioterrorism exposure: report of 2 surviving patients. *Jama* **286**, 2549-2553.

120. **Mbengue Mb.,(2001)** – 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 : **57** – UCAD – 2001

121. **Mbengue M.B – (2008)** Isolement et identification au Sénégal d'un antigène soluble immunogène de *Clostridium chauvoei*, agent du charbon symptomatique des bovins – *Bull. Soc.Pathol.Exot.*, **101**, **1**, 3 – 4

122. **Menard, A., Altendorf, K., Breves, D., Mock, M., and Montecucco, C. (1996a).** The vacuolar ATPase proton pump is required for the cytotoxicity of *Bacillus anthracis* lethal toxin. *FEBS Lett* **386**, 161-164.

123. **Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M., and Fouet, A. (1998).** The capsule and Slayer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **180**, 52-58.

124. Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, *et al.* (1994) - L'épidémie de Sverdlovsk de l'anthrax de 1979. *Science*. 1994; 266 :1202–1208..

125. **Mignot, T., Mock, M., and Fouet, A. (2003).** A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **47**, 917-927.

126. **Michel, C., Poussot, A., Chabassol, C. – (1973)** – Diagnostic bactériologique rapide de *Bacillus anthracis* par immunofluorescence. *Bull. Acad.Vét* : 333 –342.
127. **Moayeri, M., Haines, D., Young, H. A., and Leppla, S. H. (2003).** *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice. *J Clin Invest* **112**, 670-682.
128. **Mock, M., and Fouet, A. (2001).** Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**, 647-671.
129. **Mock, M., and Mignot, T. (2003).** Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. *Cell Microbiol* **5**, 15-23.
130. **Mogridge, J., Cunningham, K., and Collier, R. J. (2002).** Stoichiometry of anthrax toxin complexes. *Biochemistry* **41**, 1079-1082.
131. **Mongkolthanaruk W, Cooper GR, Mawer JSP, Allan RN, Moir A(2011).** Effect of amino acid substitutions in the GerAA protein on the function of the alanine-responsive germinant receptor of *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* **193**:2268–2275.
132. **Mourez, M., Lacy, D. B., Cunningham, K., Legmann, R., Sellman, et.al. (2002).** 2001: year of major advances in anthrax toxin research. *Trends Microbiol* **10**, 287-293.
133. **Nick, M, Cirino., Kimberlee, A, Musser et Christina, Egan. (2014).** Multiplex diagnostic platforms for detection biothreat agents. *Review* : 4, 6 : 841 – 857.
134. **O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J., and Leppla, S. (1985).** Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun* **47**, 306- 310.
135. **Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999)** KEGG:Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **27**: 29-34. gkc043 [pii].
136. **Ogawa H, Fujikura D, Ohnuma M, Ohnishi N, Hang'ombe BM, et.al, (2015).** A Novel

Multiplex PCR Discriminates *Bacillus anthracis* and Its Genetically Related Strains from Other *Bacillus cereus* Group Species.16;10(3):e0122004. Doi : 10.1371/journal.pone..

137. **Paccani, S. R., Tonello, F., Ghittoni, R., Natale, M., Muraro, L., et.al., (2005).** Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J Exp Med* **201**, 325-331.
138. **Pandey, J., and Warburton, D. (2004).** Knock-on effect of anthrax lethal toxin on macrophages potentiates cytotoxicity to endothelial cells. *Microbes Infect* **6**, 835-843.
139. **Pannifer, A. D., Wong, T. Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C.,et.al., (2001)** Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* **414**, 229 - 233.
140. **Park, J. M., Greten, F. R., Li, Z. W., and Karin, M. (2002).** Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* **297**, 2048-2051.
141. **Park, J. M., Greten, F. R., Wong, A., Westrick, R. J., Arthur, J. S.,et.al., (2005).** Signaling pathways and genes that inhibit pathogeninduced macrophage apoptosis--CREB and kappaB as key regulators. *Immunity* **23**, 319- 329.
142. **Pasteur, L., Chamberland, C., and Roux (1881).** Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près de Melun, sur la vaccination charbonneuse. *C R Acad Sci* **92**, 1378-1383.
143. **Patra, G., Vaissaire, J., Weber-Levy, M., Le Doujet, C., and Mock, M. (1998).**Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J Clin Microbiol* **36**, 3412-3414.
144. **Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M., and Montecucco, C.(1999).**Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFNgamma- induced release of NO and TNFalpha. *FEBS Lett* **462**, 199-204.

145. **Petosa, C., Collier, R. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H., and Liddington, R. C. (1997).** Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**, 833-838.
- 146 **Peter, Setlow. (2014).** Germination of spores of *Bacillus* species : What we know and what we don't know. *Journal of bacterial*. Apr 196 (7) : 1297 – 1305.
147. **Petrilli, V., Papin, S., and Tschopp, J. (2005).** The inflammasome. *Curr Biol* **15**, R581.
148. **Pezard, C., Berche, P., and Mock, M. (1991).** Contribution of individual Toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **59**, 3472- 3477.
149. **Pezard, C., Labruyere, E., and Mock, M (1994).** La maldie du charbon ; données récentes sur *Bacillus anthracis* *Bull.Soc.for.Microbiol* **9** : 7 – 11.
150. **Pimental, R. A., Christensen, K. A., Krantz, B. A., and Collier, R. J. (2004).** Anthrax toxin complexes: heptameric protective antigen can bind lethal facto and edema factor simultaneously. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 258-262.
151. **Piroth.L, Leroy.J, Rogeaux.O, Stahl.JP, Mock.M. (2010).**Recomandations thérapeutiques pour la prise en charge des patients exposés à *Bacillus anthracis* dans les circonstances naturelles – ANSES -
152. **Pomerantsev, A. P. – (1995) –** Anthrax prophylaxis antibiotics resistant strain. STI – AR I combination with urgent antibiotherapy. Commun – Oral International Workshop on Anthrax, Winchester
153. **Pomerantsev, A. P., Statuston, N.A., Mackov, Y.V., and Marion, I. J. – (1997).** Expression hemolysin AB gene in *Bacillus anthracis* vaccine strain ensure protection against experimental haemolytic anthrax infection vaccine. *Vaccine* **15**, 1846 – 1850
154. **Popov, S. G., Villasmil, R., Bernardi, J., Grene, E., Cardwell, J., Popova, T., Wu, A.,**

(2002a) human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett* **527**, 211-215.

155. **Popov, S. G., Villasmil, R., Bernardi, J., Grene, E., Cardwell, J., et al., (2002b).** Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 349-355.
156. **Poulet, P. – (1972) -** Etude comparée de *Bacillus anthracis* et de *Bacillus cereus*. Rapports antigéniques et applications au diagnostic différentiel – Thèse Vèt. Alfort.
157. **Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W., Holmes, E. C., and Maiden, M. C. (2004).** Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **186**, 7959 - 7970.
158. **Rainey, G. J., Wigelsworth, D. J., Ryan, P. L., Scobie, H. M., Collier, R. J., and Young, J.A. (2005).** Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13278-13283.
159. **Rapport Annuel LNERV – ISRA – (2009; 2010; 2011; 2013; 2014)**
160. **Ravel, J., L. Jiang, S. T. Stanley, M. R. Wilson, R. S. Decker, et al., (2009).** The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames "Ancestor". *J.Bacteriol.* **191**:445-446..
161. **Reineke K, Mathys A, Heinz V, Knorr D (2013).** Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. *Trends Microbiol.* **21**:296–304.
162. **Richard T Okinaka^{1,2*}, Erin P Price¹, Spenser R et al. (2008,)** An attenuated strain of *Bacillus anthracis* (CDC 684) has a large chromosomal inversion and altered growth kinetics *Trends Microbiol*
163. **Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, et al., (2003) May.** The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature.* **1**, 423 (6935):81-6

164. **Read TD, Salzberg SL, Pop M, Shumway M, Umayam L, et.al., (2002)** - Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA., Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011, USA. *Science*. 2002 Jun **14**;296(5575):2028-33. Epub 2002 May 9.

165. **Ravel J, Jiang L, Stanley ST, Wilson MR, Decker RS, et.al. (2009)** JanThe complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames "Ancestor". The Institute for Genomic Research, Rockville, Maryland 20850, USA. javel@som.umaryland.edu *J Bacteriol.* ;**191** (1):445- 446.

166. **Roberts, J. E., Watters, J. W., Ballard, J. D., and Dietrich, W. F. (1998).** Ltx1, a mouse locus that influences the susceptibility of macrophages to cytolysis caused by intoxication with *Bacillus anthracis* lethal factor, maps to chromosome 11. *Mol Microbiol* **29**, 581-591.

167. **Robertson, D. L., Tippetts, M. T., and Leppla, S. H. (1988).** Nucleotide sequence of the *Bacillus anthracis* edema factor gene (cya): a calmodulin-dependent adenylate cyclase. *Gene* **73**, 363-371.

168. **Ryter, A. (1965).** [Morphologic Study of the Sporulation of *Bacillus Subtilis*.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **108**, 40-60.

169. **Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et.al. (2003)** TM4: a free, open source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**: 374-378.

170. **Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, et.al. (2006)** TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* **411**: 134-193.

171. **Salles, II, Voth, D. E., Ward, S. C., Averette, K. M., Tweten, et.al. (2006).** Cytotoxic activitof *Bacillus anthracis* protective antigen observed in a macrophage cell line overexpressing ANT XR1. *Cell Microbiol* **8**, 1272-1281.

172. **Sansonetti, P. J. (2006).** The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* **7**, 1237-1242.
173. **Santelli, E., Bankston, L. A., Leppla, S. H., and Liddington, R. C. (2004).** Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature* **430**, 905-908.
174. **Scobie, H. M., Rainey, G. J., Bradley, K. A., and Young, J. A. (2003).** Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 5170-5174.
175. **Scobie, H. M., and Young, J. A. (2005).** Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr Opin Microbiol* **8**, 106- 112.
176. **Scobie, H. M., Wigelsworth, D. J., Marlett, J. M., Thomas, D., Rainey, et.al.(2006)** Anthrax toxin receptor 2 dependent lethal toxin killing in vivo. *PLoS Pathog* **2**, e111.
177. **Sellman, B. R., Nassi, S., and Collier, R. J. (2001).** Point mutations in anthrax protective antigen that block translocation. *J Biol Chem* **276**, 8371- 8376.
178. **Seong, S. Y., and Matzinger, P. (2004).** Hydrophobicity: an ancient damage- associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **4**, 469-478.
179. **Setlow, P. (2015)** Germination of spores of *Bacillus anthracis* species : What We Know and Do Not Know – *J Bacteriol*, 196, 1297 - 1305
180. **Sheppard, S. K., X. Didelot, K. A. Jolley, A. E. Darling, B. Pascoe et.al. (2013.)** Progressive genome-wide introgression in agricultural *Campylobacter coli*. *Mol.Ecol.* **22**:1051-1064.
181. **Shlyakhov, E. N., and Rubinstein, E. (1994).** Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine* **12**, 727-730.
182. **Sinsanthana M et al., 19. (2002) - Anthrax du tractus gastro-intestinal** *Emerg Infect Dis* **8**:649-

183. **Singh, Y., Leppla, S. H., Bhatnagar, R., and Friedlander, A. M. (1989).** Internalization and processing of *Bacillus anthracis* lethal toxin by toxin- sensitive and -resistant cells. *J Biol Chem* **264**, 11099-11102.
184. **Sirard, J. C., Mock, M., and Fouet, A. (1994).** The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *J Bacteriol* **176**, 5188-5192.
185. **Sirard, J.C., Weber, M., Dufflot, M., Popoff, R. and Mock, M. –(1997)** A recombinant *Bacillus anthracis* strain producing the *Clostridium perfringens* Ib component induces protection against toxins. *Infect immune* **6566** : 2029 – 2033
186. **Sirisanthana, T., and Brown, A. E. (2002).** Anthrax of the gastrointestinal tract. *Emerg Infect Dis* **8**, 649-651.
187. **Smith, H., and Keppie, J. (1954).** Observations on experimental anthrax; demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by *Bacillus anthracis*. *Nature* **173**, 869-870.
188. **Smith, H., Keppie, J., and Stanley, J. L. (1955).** The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. V. The specific toxin produced by *B. Anthracis* in vivo. *Br J Exp Pathol* **36**, 460-472.
189. **Song, J., Y. Xu, S. White, K. W. Miller, and M. Wolinsky. (2005).** SNPsFinder--a web-based application for genome-wide discovery of single nucleotide polymorphisms in microbial genomes. *Bioinformatics*. **21**:2083-2084.
190. **SSA (2004).** Protection médicale contre le risque biologique militaire. Ministère de la défense, Service de Santé des Armées.
191. **Stanley, J. L., and Smith, H. (1961).** Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. *J Gen Microbiol* **26**, 49-63.

192. **Steele, A. D., Warfel, J. M., and D'Agnillo, F. (2005).** Anthrax lethal toxin enhances cytokine induced VCAM-1 expression on human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 1249-1256.
193. **Sterne, M. (1937a).** Avirulent anthrax vaccine. *Onderstepoort J Vet Sci Animal Ind* **7**, 41-43.
194. **Sterne, M. (1937b).** Variation in *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J Vet Sci Animal Ind* **8**, 271-349.
195. **Stragier, P., and Losick, R. (1996).** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **30**, 297-241.
196. **Strauch, M. A., Ballar, P., Rowshan, A. J., and Zoller, K. L. (2005)** The DNA- binding specificity of the *Bacillus anthracis* AbrB protein. *Microbiology* **151**, 1751-1759.
197. **Sun S, Chen J, Li W, Altintas I, Lin A, Peltier S, Stocks K, et.al., (2011)** Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource. *Nucleic Acids Res* **39**: D546-D551.
198. **Sweeney, D. A., C. W. Hicks, X. Cui, Y. Li, and P. Q. Eichacker. (2011).** Anthrax infection. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **184**:1333-1341.
199. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011)** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.
200. **Tang, G., and Leppla, S. H. (1999).** Proteasome activity is required for anthrax lethal toxin to kill macrophages. *Infect Immun* **67**, 3055-3060.
201. **Tarling, J. D., Lin, H. S., and Hsu, S. (1987).** Selfrenewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *J Leukoc Biol* **42**, 443-446.

202. **Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, et.al., (2001)** The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* **29**: 22-28.
203. **Tatusov RL et al. (2003) - The COG database: an updated version includes eukaryotes** *BMC Bioinformatics* **11**, 4 - 41..
204. **Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, et.al., (2005)** Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13950-13955.
205. **Tournier, J. N., and Quesnel-Hellmann, A. (2006).** Host-pathogen interactions: a biological rendezvous of the infectious nonself and danger models? *PLoS Pathog* **2**, e44.
206. **Tournier, J. N., Quesnel-Hellmann, A., Cleret, A., and Vidal, D. R. (2007).** Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell Microbiol* **9**, 555-565.
207. **Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003).** NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 95-104.
208. **Tucker, A. E., Salles, II, Voth, D. E., Ortiz-Leduc, W., et.al.,(2003).** Decreased glycogen synthase kinase 3-beta levels and related physiological changes in *Bacillus anthracis* lethal toxin-treated macrophages. *Cell Microbiol* **5**, 523-532.
209. **Turnbull, P. C. (2000).** Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. *Curr Opin Infect Dis* **13**, 113-120.

210. **Ulmer, T. S., Soelaiman, S., Li, S., Klee, C. B., Tang, W. J., and Bax, A. (2003).** Calcium dependence of the interaction between calmodulin and anthrax edema factor. *J Biol Chem* **278**, 29261-29266.
211. **Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y. (2002).** Characterization of the *Bacillus subtilis* ywsC gene, involved in gamma-polyglutamic acid production. *J Bacteriol* **184**, 337-343.
212. **.R. Urwin & M.C. Maiden, (2003),** Multi-Locus Sequence frappe: un outil pour l'épidémiologie mondiale. *Trends Microbiol.*, 11
213. **Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1998).** Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 706-711.
- 214.. **Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M., and Montecucco, C. (2000).** Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem J* **352 Pt3**, 739-745.
215. **Voth, D. E., Hamm, E. E., Nguyen, L. G., Tucker, A. E., Salles, II, Ortiz-Leduc, W., and Ballard, J. D. (2005).** *Bacillus anthracis* oedema toxin as a cause of tissue necrosis and cell type-specific cytotoxicity. *Cell Microbiol* **7**, 1139-1149.
216. **Warfel, J. M., Steele, A. D., and D'Agnillo, F. (2005).** Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. *Am J Pathol* **166**, 1871- 1881.
217. **Wei, W., Lu, Q., Chaudry, G. J., Leppla, S. H., and Cohen, S. N. (2006).** The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* **124**, 1141-1154.
218. **Welkos, S. L., and Friedlander, A. M. (1988).** Comparative safety and efficacy against

Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice. *Microb Pathog* **5**, 127-139.

- 219.. **Whiting, G. C., Rijpkema, S., Adams, T., and Corbel, M. J. (2004).** Characterisation of adsorbed anthrax vaccine by two-dimensional gel electrophoresis. *Vaccine* **22**, 4245 - 4251.
220. **Wright, G. G., Green, T. W., and Kanode, R. G., Jr. (1954).** Studies on immunity in anthrax. V. Immunizing activity of alum-precipitated protective antigen. *J Immunol* **73**, 387-391.
221. **Wright, G. G., and Puziss, M. (1957).** Elaboration of protective antigen of *Bacillus anthracis* under anaerobic conditions. *Nature* **179**, 916 - 917.
222. **Wright, G. G., and Mandell, G. L. (1986).** Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. *J Exp Med* **164**, 1700-1709.
223. **Wu, A. G., Alibek, D., Li, Y. L., Bradburne, C., Bailey, C. L., and Alibek, K. (2003).** Anthrax toxin induces hemolysis: an indirect effect through polymorphonuclear cells. *J Infect Dis* **188**, 1138-1141.
224. **Zwartouw, H. T., and Smith, H. (1956).** Polyglutamic acid from *Bacillus anthracis* grown *in vivo* : structure and aggressin activity. *Biochem J* **63**, 437- 454.

WEBOGRAPHIE

- 1 : <http://www.genome.jp/dbget-bin/www.bget>
- 2 : <http://www.genome.jp/KEGG>
- 3 : <http://www.fr.wikipedia.org/wiki/classification/phylogenetique>;
- 4 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 5 : <http://agmed.sante.gouv.fr>
- 6 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/fiew.cgi>
- 7 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/palox.cgi?fun=all>
- 8 : <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/477>
- 9 : <http://jb.asm.org/content/194/15/4116.full.pdf>
- 10 : <http://jb.asm.org/content/191/1/445.full>
- 11 : <http://www.straininfo.net/genomes/309>

ANNEXES

ANNEXE I

Article 1 - V009/14 Accepté en Août 2015: A Paraître dans la prochaine revue Dakar – Médical – Octobre 2015

Caractérisation de souches Sénégalaises et Gambienne de *Bacillus anthracis*, agent de la maladie charbonneuse des ruminants

Mbengue Mb₁, Ndiaye Md₂

- 1) Laboratoire National de l’Elevage et des Recherches Vétérinaires, Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA),
- 2) Laboratoire de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD)

Auteur correspondant : Mbaye Mbengue LNERV – ISRA – BP 2057 – Dakar
Hann- Sénégal.

E-mail: mbenguem@yahoo.fr

Information sur le financement de cette activité : Ce travail a été financé par la fondation Méditerranéenne de recherches sur les maladies infectieuses tropicales et émergentes (URMITE):

Caractérisation de souches Sénégalaises et Gambienne de *Bacillus anthracis*, agent de la maladie charbonneuse des ruminants

RESUME :

Introduction : La maladie charbonneuse ou Anthrax ou charbon bactérien est due à une bactérie de la famille des Bacillaceae, *Bacillus anthracis* (dénommée Bactérie charbonneuse par Davaine en 1863) qui a fait l'objet d'une attention particulière au Sénégal, par les importantes pertes économiques occasionnées sur le cheptel ruminant dans certaines zones écologiques plus précisément dans la zone des Niayes .

Bacillus anthracis, agent de l'anthrax, est classé dans la catégorie A des armes biologiques. 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 Méthodes : 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 de *Bacillus anthracis* grâce à l'outil informatique. Nous avons estimé que le pan-génome renfermait 2893 cores génomes, 7 gènes uniques et 85 gènes accessoires.

Résultats : Nous avons trouvé que les souches Sénégalaises et Gambienne étaient porteuses chacune des deux plasmides pXO1 et pXO2, responsables de la virulence de *B. anthracis*. Et que les séquences oligonucléotidiques obtenues après analyse moléculaire et bio informatique de ces génomes offrent une identité de séquence pour la souche *Bacillus anthracis* dans les deux pays ciblés.

Conclusion : Cette séquence de *Bacillus anthracis* a été comparée et est identique à celle obtenue à partir du génome de la souche Sterne (Institut Pasteur de Paris) de la souche CDC 684 (NCBI – USA) et de celle de la H9401 trouvée chez un humain atteint d'Anthrax en Corée (<http://j.b.asm.org/content/194/15/4116.full.pdf>); nous avons validé l'hypothèse selon laquelle les souches de *Bacillus anthracis* testées ont une pan-génome de type fermé.

MOTS CLES

Bacillus anthracis, Gambie, pan- genome, Sénégal,

SUMMARY:

Introduction :Anthrax is a disease caused by a bacterium of the Bacillaceae family, *Bacillus anthracis* (called by Davaine in 1863) and has been a subject of particular attention in Senegal, through important economic losses on ruminant livestock in some ecological zones more precisely in the Niayes's area. *Bacillus anthracis* is the causative agent of anthrax and is classified as a 'Category A' biological weapon. Six complete genomes of *B. anthracis* (A0248, 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 for them to make a response that could be reassuring about the identity of these three strains and to precise the nature for ,*Bacillus anthracis* pan- genome. We estimated that the *B. anthracis* pan-genome has 2893 core genes (99% of the genome size) and 85 accessory genes.

Results : We found that the Senegalese and Gambian strains were carrying the two plasmids pXO1 and pXO2, responsible for the virulence of the bacterium.

The study of oligo nucleotide sequences obtained after molecular and bioinformatics analysis of these genomes showed that they have the same size, the same value of the G + C %, the same average number of protein than other strains like CDC 684.

Comparative genomics studies allow us to show a strong similarity in these strains of *Bacillus anthracis* (Sen2 and Gmb 1) .

Conclusion : This sequence of *Bacillus anthracis* has been compared and is identical to that obtained from the genome of the Sterne strain and the CDC strain 684 (NCBI) 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,

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 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 plus part 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] est requis pour la synthèse de trois protéines toxigènes : le facteur oedématogène, le facteur létal et l'antigène protecteur. Ces protéines agissent par combinaison pour la production de toxines : A 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 essentiel de ce travail est précisément 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.

Matériel et Méthodes :

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'Etudes 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 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 sur 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 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 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 Ancêstor [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 années 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 : 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 : A partir de méthodes informatiques .Et surtout une étude pangénomique a été réalisée 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 :** - **Méthode d'alignement - MAUVE** (**M**ultiple **G**enome **M**olecular **E**volutionary **G**enetics **A**nalysis) qui est une méthode d'alignement et **MEGA5** (Analyse moléculaire génétique évolutive ou **M**olecular **E**volutionary **G**enetics **A**nalysis).

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 de nos 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, nous pouvons dire que 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 1a** aussi donné un signal important :

Microséquençage des souches et analyse génomique : Caractéristiques moléculaires des souches : Les résultats sont rapportés dans le tableau II suivant 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 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

Puis, nous avons regardé 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 : figure 2 : Analyse des résultats obtenus avec KEGG. Ces différences trouvées entre les souches concernent la transduction, le processus et la motilité cellulaire qui sont plus importants pour nos trois souches testées à savoir Sen2, Sen3 et Gmb1 en comparaison aux autres.

Comparaison génomique COG et PCA : Figure 3 : 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 4 : 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. Nos 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. La comparaison avec le pan-génome de souches pathogènes humaines avec la colonne pourcentage (%) sont rapportés dans le tableau III.

De plus, nous avons fait le rapport noyau / pan-génome et nous avons trouvé que le génome de base représentait 99% du pan-génome (tableau III). 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.anthraxis* constitue une protéine ancienne probablement de 150 ans et qui a cessé d'évoluer.

Discussions

- **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.*, 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 a été 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** : Tout d'abord, concernant les caractéristiques générales des trois nouvelles souches Sénégalaises et Gambienne : elles ont toutes la même taille, la même valeur du C+C% et le même nombre moyen de protéines que les autres souches référenciées. 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.anthraxis* 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.anthraxis* 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.anthraxis* qui est une souche ancienne qui s'est stabilisée 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, 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.*, 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 (Tettlin *et al.*, 2005), à savoir la structure du pan-génome de *B.anthraxis* 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 nous permet de montrer une très forte similarité au sein des souches de *B.anthraxis* Sen2, Sen3 et Gmb1 ce qui pourrait contribuer à la mise au point d'une souche vaccinale recombinante commune dans les deux pays ciblés. *B.anthraxis* est découvert il y'a 150 ans mais a gardé le même contenu génomique (pas avoir évolué avec le temps). Comme dit dans la littérature, on retrouve les caractéristiques spécifiques d'un pan - génome étroit et fermé ce qui vient corroborer les observations faites par Tettlin H *et al.*, 2005 [7] sur l'étude d'un pan - génome obtenu à partir de l'analyse de génome d'isolats de souches de *Streptococcus agalactiae* [7]. Nous sommes dans le cas d'un pan-génome très fermé avec une espèce qui ne vit pas dans l'environnement.

Références

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, and Roux M.-** Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près de Melun, sur la vaccination charbonneuse. C R Acad Sci. 188 ; **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 detec-tion 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
6. **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.
7. **Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, and col.** Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; **102**: 13950-13955
8. **Mbengue Mb. –** 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. 2001 ; thèse 3 ème cycle : **57** – UCAD –
9. **Mbengue MB. –** 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
10. **Read TD, Peterson SN, Tourasse N, and coll.** - The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. Nature. 2003; 4 (6935):81-6.
11. **Ravel J, L Jiang, S T Stanley, M R Wilson, and Coll.** The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames "Ancestor". J Bacteriol. 2009; **191**:445-446.
12. **Richard T Okinaka, Erin P Price, Spenser R Wolke and coll. -** An attenuated strain of *Bacillus anthracis* (CDC 684) has a large chromosomal inversion

and altered growth kinetics. *Nature*. 2008; 2 – 4

13. Read TD, Peterson SN, Tourasse N, and coll. - The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. Nature. 2003; 423 (6935):81-6
14. **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

Légende

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	USA	Beefmaster femelle de 14 années	/
	Ancestor		d'âge Génisse	
/	A0248	USA	Humain	/
/	H9401	Korea	Humain	/
/	CDC684	USA	Humain	/
/	Sterne	UK	/	/

Tableau II: Caractéristiques moléculaires des souches.

Souches	Plasmid	Taille (Mb)	GC%	Protéines
<i>Bacillus anthracis</i> souche. Ames	/	5.23	35.4	5,328
<i>Bacillus anthracis</i> souche. CDC 684	pX01, pX02	5.23	35.4	5,579
<i>Bacillus anthracis</i> souche. Sterne	/	5.23	35.4	5,289
<i>Bacillus anthracis</i> souche. 'Ames Ancestor'	pX01, pX02	5.23	35.4	5,208
<i>Bacillus anthracis</i> souche. A0248	pX01, pX02	5.23	35.4	5,041
<i>Bacillus anthracis</i> souche. H9401	BAP1, BAP2	5.22	35.4	5,479
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Sen2Col2 (G192)	pX01, pX02	5.23	35,2	5,487
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Sen3 (G193)	pX01, pX02	5.23	35,2	5,493
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Gmb1 (G194)	pX01, pX02	5.23	35,3	5,502
<i>Bacillus anthracis</i> souche.Sen1 (G195)	/	/	/	/

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

Espèces	Génome 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

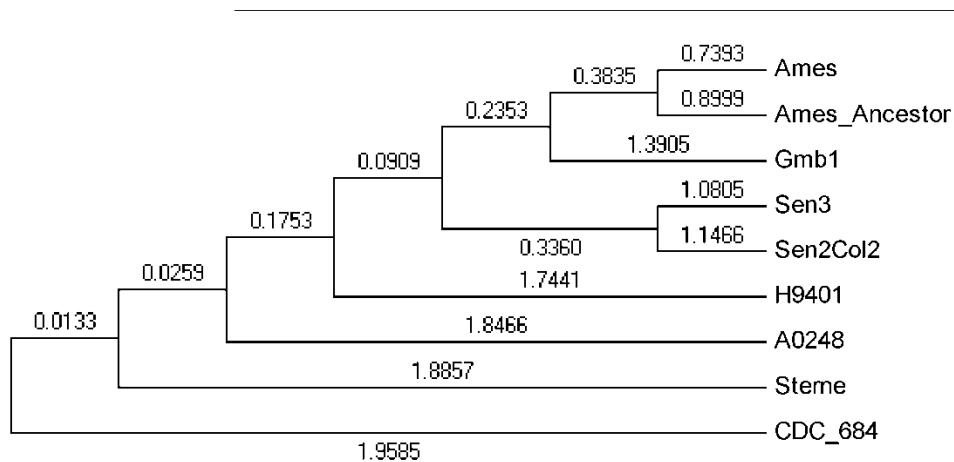
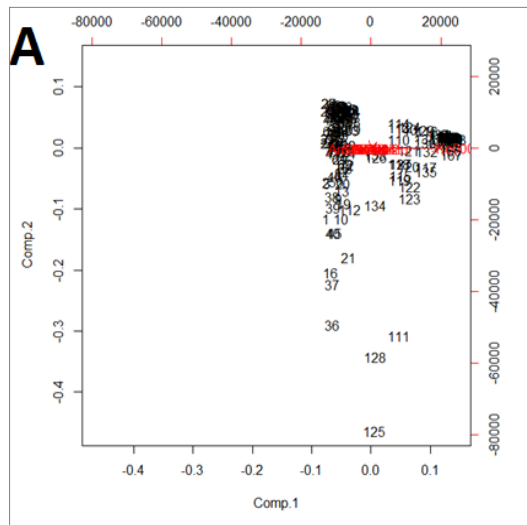


Fig 1 ; Arbre phylogénétique base sur les génomes complets.



B

KEGG classes	KEGG subclasses	Ko description	A0248	'Ames Ancestor'	Ames	H9401	Sterne	CDC684	Sen2Col2	Sen3	Gmb1
Metabolism	Carbohydrate Metabo	00562 Inositol phosphate metabolism	10	10	11	11	11	11	11	11	11
Metabolism	Lipid Metabolism	01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Metabolism	AA Metabolism	00260 Glycine, serine and threonine metabolism	27	26	26	27	27	27	27	27	27
Metabolism	AA Metabolism	00300 Lysine biosynthesis	12	12	12	12	13	13	13	13	13
Metabolism	AA Metabolism	00340 Histidine metabolism	18	19	19	19	19	19	19	19	19
Metabolism	Metabo of Other AA	00440 Phosphonate and phosphinate metabolism	3	3	3	4	4	4	4	4	4
GIP	Translation	03010 Ribosome	54	54	54	53	54	54	54	54	54
GIP	Replication and Repair	03440 Homologous recombination	19	18	19	19	19	19	19	19	19
EIP	Membrane Transport	02010 ABC transporters	76	79	79	80	80	80	80	80	80
EIP	Signal Transduction	02020 Two-component system	58	59	59	62	63	62	62	62	62
Cellular Processes	Cell Motility	02040 Flagellar assembly	21	21	21	24	24	24	24	24	24
Human Diseases	Infectious Diseases	05100 Bacterial invasion of epithelial cells	0	0	1	1	1	1	1	1	1

- Figure 2: Analyse des résultats obtenus avec KEGG. A/ Résultats du PCA :

Les nombres colorés en noir correspondent au nombre ko. En rouge, nous avons les souches. B/ Tableau des voies métaboliques où nous avons trouvé quelques différences entre les souches.

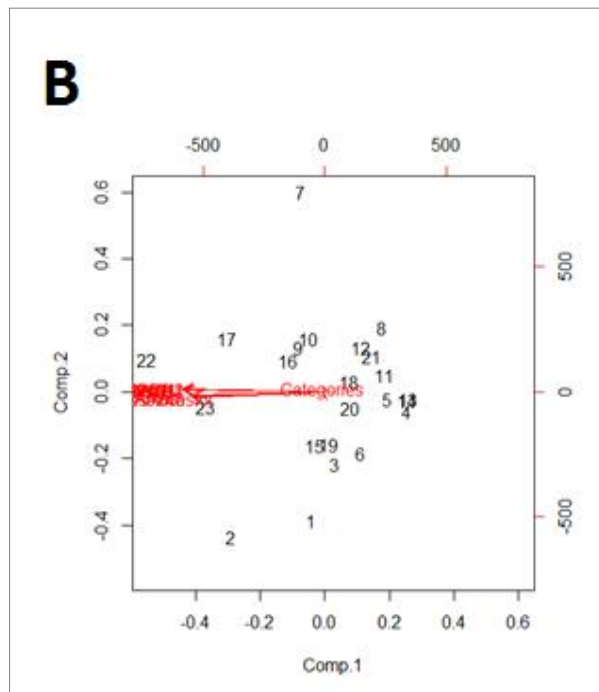
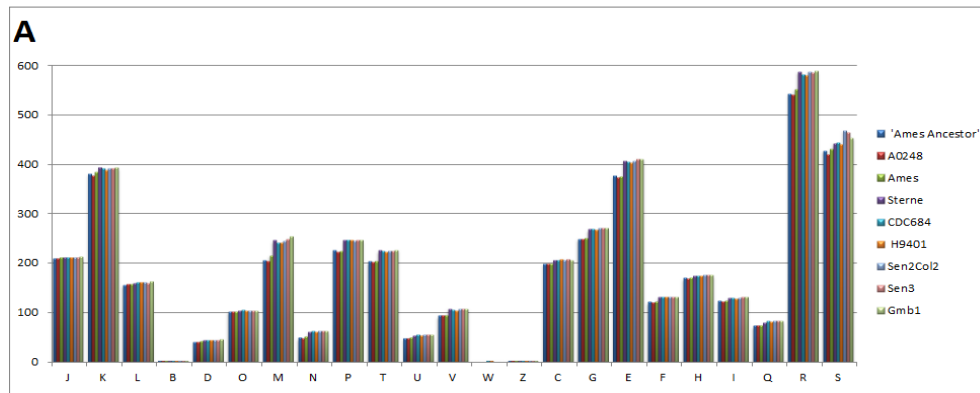


Figure 3: Analyse des résultats du COG. A/ Distribution des différentes catégories de COG parmi les souches. B/ Résultats du PCA. Les nombres en noir correspondent aux catégories du COG. En rouge nous avons les souches

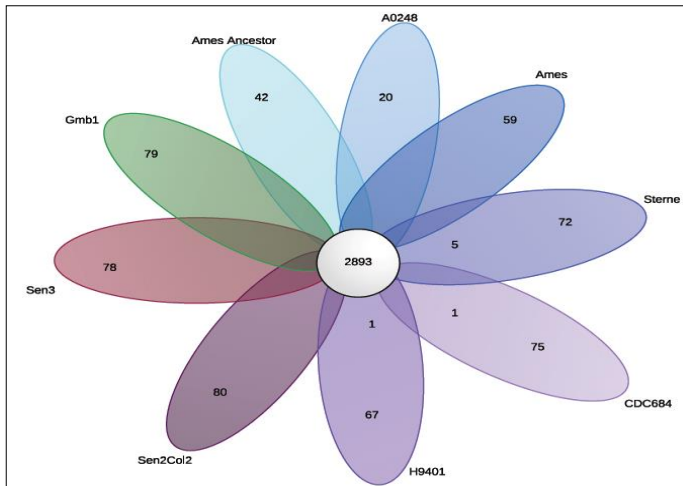


Figure 4 : Pan- génome de *Bacillus anthracis* : pot de fleurs montrant : le pan - génome de *Bacillus anthracis*. Le nombre dans le cercle est le génome de base. Les chiffres dans la partie supérieure des pétales constituent le nombre de gènes accessoires présents dans chaque souche (sur les 85 au total). Les chiffres à la partie inférieure des pétales est le nombre de gènes uniques dans chaque souche.

ANNEXE II

10.1002/nmi2.62

Article 2 : Paru dans la Revue New Microbes and New Infection

Genomic analysis of three African strains of *Bacillus anthracis* demonstrates that they are part of the clonal expansion of an exclusively pathogenic bacterium

L. Rouli¹, M. MBengue², C. Robert¹, M. Ndiaye³, B. La Scola¹ and D. Raoult¹

1) Aix Marseille Université, URMITE, UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Marseille, France, 2) Laboratoire National d'Élevage et des Recherches Vétérinaires (LNERV), Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Hann, Dakar, Senegal and 3) Laboratoire de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar (UCAD), Dakar, Senegal

Abstract

Bacillus anthracis is the causative agent of anthrax and is classified as a 'Category A' biological weapon. Six complete genomes of *B. anthracis* (A0248, Ames, Ames Ancestor, CDC684, H0491, and Sterne) are currently available. In this report, we add three African strain genomes: Sen2Col2, Sen3 and Gmb1. To study the pan-genome of *B. anthracis*, we used bioinformatics tools, such as Cluster of Orthologous Groups, and performed phylogenetic analysis. We found that the three African strains contained the pX01 and pX02 plasmids, the nonsense mutation in the *plcR* gene and the four known prophages. These strains are most similar to the CDC684 strain and belong to the A cluster. We estimated that the *B. anthracis* pan-genome has 2893 core genes (99% of the genome size) and 85 accessory genes. We validated the hypothesis that *B. anthracis* has a closed pan-genome and found that the three African strains carry the two plasmids associated with bacterial virulence. The pan-genome nature of *B. anthracis* confirms its lack of exchange (similar to *Clostridium tetani*) and supports its exclusively pathogenic role, despite its survival in the environment. Moreover, thanks to the study of the core content single nucleotide polymorphisms, we can see that our three African strains diverged very recently from the other *B. anthracis* strains.

Keywords: African strains, *Bacillus anthracis*, pan-genome, pathogen, specialization

Original Submission: 24 June 2014; Revised Submission: 4 July 2014; Accepted: 8 August 2014

New Microbe and New Infect

Corresponding author: D. Raoult, URMITE, UMR CNRS 7278, IRD 198, INSERM U1095, Faculté de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France
E-mail: didier.raoult@gmail.com

Funding Information: This work was supported by the Mediterranean Infection Foundation.

Introduction

Blackleg, or anthrax, was the first disease to be linked to a specific microbe by Davaine in 1863 and the first animal

infection for which a vaccine was proposed (by Pasteur, 1881) [1]. In 1876, Koch discovered the first bacterium, *Bacillus anthracis*, which had the capacity to transform into spores [1]. *Bacillus anthracis* belongs to the phylum Firmicutes and is part of the *Bacillus cereus* group [2]. It is a Gram-positive,

spore-forming soil bacterium [2] that is a facultative anaerobe [3], able to survive in extreme and unfriendly environmental conditions, such as high levels of radiation or extreme temperature [2], and remain viable in the soil over a long period of time [4]. *Bacillus anthracis* is the causative agent of the zoonotic disease anthrax [2], to which cattle and horses are particularly sensitive [1]. Human infections can occur through the ingestion or inhalation of spores or through contact with the skin [2]. Four clinical syndromes for anthrax disease exist [4]: cutaneous anthrax (95% of reported cases), gastrointestinal anthrax due to contaminated food, inhalational anthrax and injectional anthrax. *Bacillus anthracis* is classified as a 'Category A' biological weapon [2]. Due to the stability of its spores, its high pathogenicity and lethality, and its capacity to be inhaled [5], the weaponization of *B. anthracis* by US [1] and Soviet armed forces has led to two series of cases, as reported by a US Army investigator and identified through genomic analysis [6]. Additionally, an anthrax epidemic caused by

atmospheric contamination from a military laboratory occurred in 2001 [1,7], leading to an increase in research about *B. anthracis* and anthrax [5] and prompting the emergence of a new detection system [2].

Compared with *B. cereus*, *B. anthracis* has a nonsense mutation in the *plcR* gene at position 640 [7] and four prophage regions. *Bacillus anthracis* strains can be classified into three different lineages (A, B or C) [8] based on multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) [9–11]. Lineage A, which is found worldwide, is divided into four sub-lineages: A1, A2, A3 and A4. Lineage B is divided into two sub-lineages, B1 and B2, with B1 found in southern Africa and B2 in southern and Eastern Europe. Lineage C is rare.

The first pan-genomic study was published in 2005 on *Streptococcus agalactiae* [9], and the number of such studies has increased rapidly since then. A pan-genome is defined as the pool of all genes present in all the studied genomes of a species, which allows for a comparison between different species or strains. The pan-genome can be divided into different parts: the core genome (genes present in all the genomes), accessory genes (genes present in several genomes but not all) and unique genes (genes present in only one of the studied isolates). Additionally, the pan-genome can be closed or open, depending on the capacity of the species to acquire new genes [9] and the age of the initial clone. The capacity of the species to gain genes can be evaluated by studying its mobilome. Its age can be determined using the single nucleotide polymorphism (SNP) observation process in the core genome [10–12].

African strains of *B. anthracis* from Gambia and Senegal have not yet been studied [13]. In this study, we compiled the *B. anthracis* pan-genome based on three African strains (two from Senegal and one from Gambia) and six reference genomes (Ames [14], Ames Ancestor [12], A0248, CDC684 [15], H9401 [13] and Sterne). The Ames strain is the non-virulent version of the Ames Ancestor strain and was the strain found in letters in the USA in 2001. Virulence is linked to the presence of two plasmids, pX01 and pX02, which carry genes encoding for toxins, as well as the capsule [4]. Our work demonstrates that the three African strains are very closely related to the other strains, especially CDC684, contain the pX01 and pX02 plasmids, belong to the worldwide lineage A and have a closed pan-genome.

Materials and Methods

Bacteriological studies

Organ harvesting was conducted at different sites according to biosecurity procedures. Cultures were grown in a liquid medium consisting of a nutrient broth (Liofilchem s.r.l.,

#610037, Roseto degli Abruzzi, Italy). The bacteriological study procedure included the following steps. After seeding on trypticase soy agar (Bio-Rad, #64946, Marnes-la-Coquette, France), the bacterial mixture was incubated at 37°C for 24 h. The bacteria were then streaked on Columbia sheep blood agar (blood culture) and incubated as previously described. Isolates were assessed for Gram positivity using Gram staining and were seeded for biochemical characteristic studies.

Eight isolates suspected as possibly being *B. anthracis* were sent to the URMITE laboratory. Identification was performed using a system based on the molecular detection of the *pag* gene under previously described conditions [14]. The production of acetyl methyl carbinol, as well as the fermentation of certain sugars, was assessed on isolates identified as *B. anthracis*, using previously reported methods [15]. Cultural, morphological and biochemical characteristics were studied in detail using conventional methods. The experimental pathogenicity of the *B. anthracis* strains was assessed using strain BALB/c white mice (age 6 months). These mice were offered by the Pasteur Laboratory institute of Dakar. Intraperitoneal inoculations of 500 IL of the isolated *B. anthracis* cultures was administered (culture at 104 CFU/mL), and the animals were monitored for 24 h. Autopsies were performed post-mortem, and Giemsa-stained smears of the spleen were observed using a microscope at 100 $\times$ magnification after immersion.

In the pathogenicity experiments that were performed on white mice, two experimental mice received 500 IL of the bacterial culture intraperitoneally and two control mice received only 500 IL of physiological buffer. These mice were monitored in the laboratory.

When the mice died, an autopsy was performed and *B. anthracis* was identified by examining Giemsa-stained smears of the spleen [15].

Sequencing

Sequencing of the Sen2col2, Sen3 and Gmb1 strains of *B. anthracis* were performed using the SOLiD 4 Life Technology's New Generation Sequencing technology. The paired end library was constructed from 1 lg of purified genomic DNA from each strain. The sequencing was carried out to 50 935 base pairs (bp) using SOLiD™ V4 chemistry on one full slide associated with 96 other projects on an Applied Biosystems SOLiD 4 machine (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All 96 genomic DNA samples were barcoded with the module 1–96 barcodes provided by Life Technologies (Paisley, UK). The libraries were pooled in equimolar ratios, and emPCR (PCR by emulsion) was performed according to the manufacturer's specifications, using templated bead preparation kits on the EZ bead automated Emulsifier, Amplifier and Enricher E80 system for full-scale coverage. A total of 708 million P2-positive beads

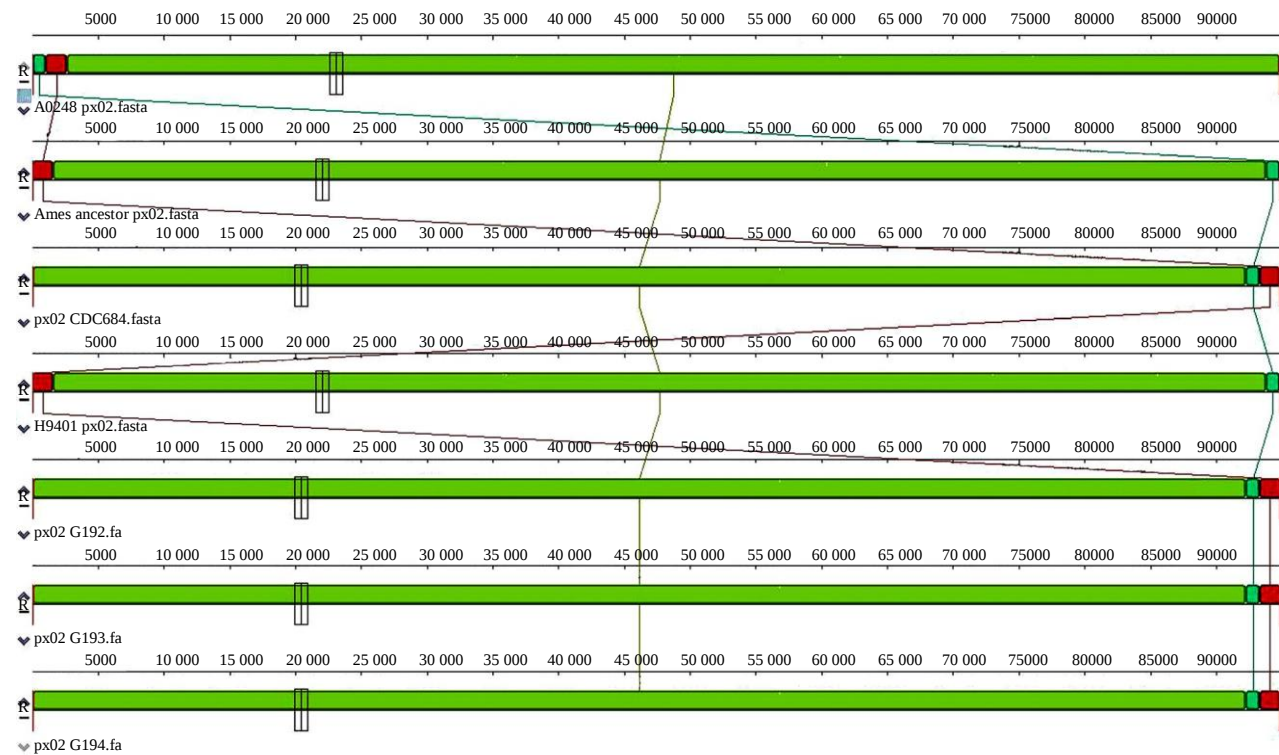


FIG. 1. G192: Sen2Col2, G193: Sen3 and G194: Gmb1. MAUVE global alignment on pX02 plasmids.

were loaded onto the flow cell for the run, and the output read length was 85 bp, as expected (50 9 35 bp). The three

B. anthracis genomes (Sen2col, Sen3 and Gmb1) were sequenced through $3.2^E + 6$, $3.1^E + 6$ and $3.9^E + 6$ barcode reads, which led to 273, 262 and 382 Mb of data, respectively. The global sequencing of these three genomes resulted in 917 Mb of data.

For each of the three strains, we performed a mapping against the Ames reference strain though CLC workbench software. For mapping we used relatively stringent parameters (length fraction of 0.7 and similarity fraction of 0.8).

Basic genomic data

The complete genomic sequences of the six references strains are available on NCBI: Ames [16] (NC_003997.3), Ames Ancestor [12] (NC_007530.2), A0248 (NC_012659.1), CDC684 [17] (NC_012581.1), H9401 [13] (NC_017729.1) and Sterne (NC_005945.1). The sequences of the plasmids pX01 and pX02 from A0248, Ames Ancestor, CDC684 and H9401 are also available on NCBI: NC_012656.1, NC_012655.1, NC_007322.2, NC_007323.3, NC_012579.1, NC_012577.1, NC_017726.1, NC_017727.1, respectively. H9401 came from Korea, Sterne came from the UK, and the four other strains came from the USA. Our strains of interest came from Senegal (Sen2Col2 [PRJEB1516] and Sen3

[PRJEB1517]) and Gambia (Gmb1 [PRJEB1518]) and were isolated in 2010. Sen2Col2 was isolated from the lungs of a 6-year-old ostrich. Sen3 was isolated from the lungs, liver, spleen and blood of a Touabire sheep. Finally, Gmb1 was isolated from the blood of a trypanotolerant zebu cow. The sequences of these three African strains and their plasmids were obtained from the SOLiD data.

Genomic analysis

Determination of gene functions and the *B. anthracis* mobilome. To study genomic content and perform functional analysis, we first used CAMERA [18], a bioinformatics portal that can perform several types of analysis. In this portal, we performed cluster of orthologous groups (COG) analysis [19] to assign functional annotations to proteins, which were classified into categories (the list is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/palox.cgi?fun=all>). Next, we investigated metabolic pathways using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [20] () data and the data generated KEGG by the KAAS [21] (KEGG Automatic Annotation Server) online tool. In KEGG, the proteins were classified into classes and subclasses. We also used RAST [22] to annotate the new strains and their plasmids and to find the mobilome. Regarding the mobilome, we also used CRISPRfinder [23] and PHAST [24]. We used MeV [25,26] (Multi Experiment Viewer) to best visualize the distribution of

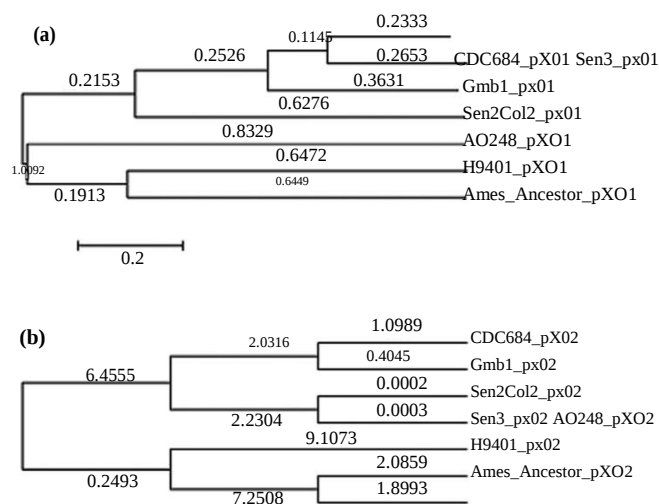


FIG. 2. Numbers on the branches correspond to branch length. (a) Tree based on the pXO1 plasmid. (b) Tree based on the pXO2 plasmid.

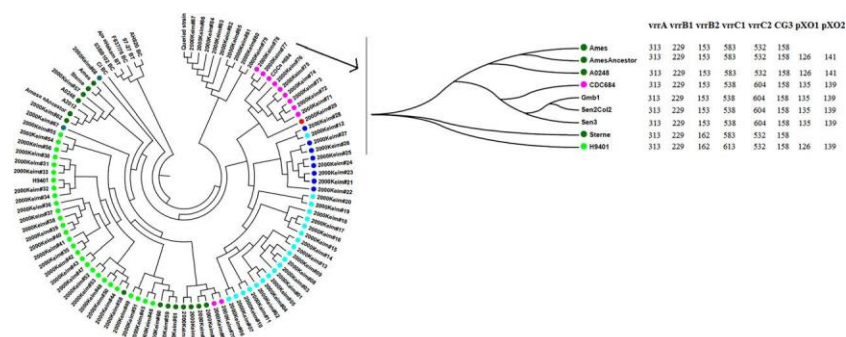


FIG. 3. Multi locus VNTR analysis tree. Colours correspond to lineages: light blue, A1a; dark blue, A1b; red, A2; light green, A3a; dark green, A3b; blue green, other A3; pink, A4.

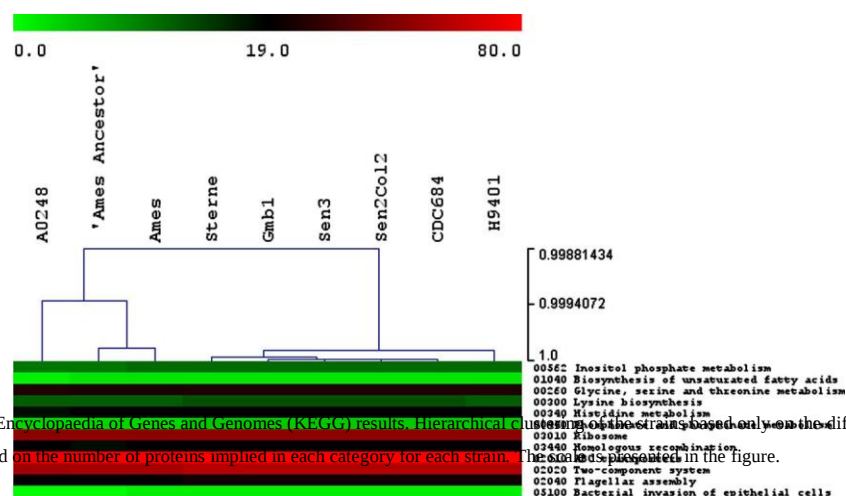


FIG. 4. Analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) results. Hierarchical clustering of the strains based on the difference in the KEGG pathway distribution. Colours depend on the number of proteins implied in each category for each strain. The results are presented in the figure.

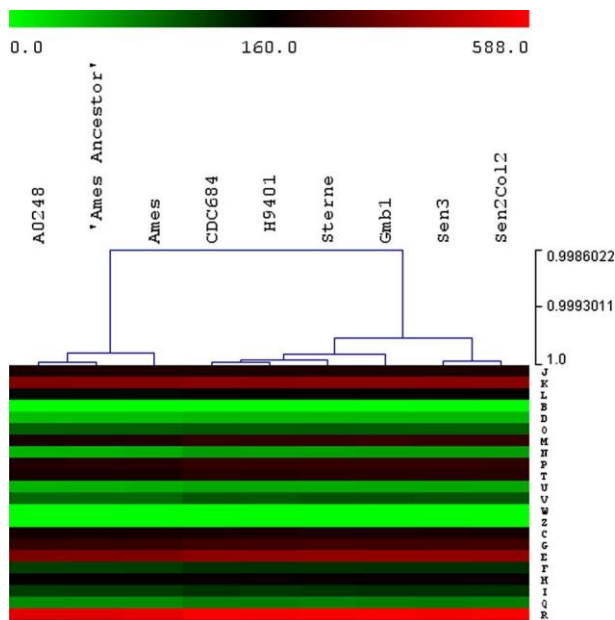


FIG. 5. Clustering of the strains based on the distribution of all the Cluster of Orthologous Groups categories. J, translation, ribosomal structure and biogenesis; K, transcription; L, replication, recombination and repair; B, chromatin structure and dynamics; D, cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; O, post-translational modification, protein turnover, chaperones; M, cell wall/membrane/envelope biogenesis; N, cell motility and secretion; P, inorganic ion transport and metabolism; T, signal transduction mechanisms; U, intracellular trafficking, secretion and vesicular transport; V, defence mechanisms; W, extracellular structures; Z, cytoskeleton; C, energy production and conversion; G, carbohydrate transport and metabolism; E, amino acid transport and metabolism; F, nucleotide transport and metabolism; H, coenzyme transport and metabolism; I, lipid transport and metabolism; Q, secondary metabolite biosynthesis, transport and catabolism; R, general function prediction only; S, function unknown. Colours depend on the number of proteins implied in each category for each strain. The scale is presented in the figure.

the accessory genes and to perform hierarchical clustering on the COG and KEGG data.

Phylogeny, MLVA and orthology. We performed a global genome alignment using MAUVE [27] and a multiple alignment with MEGA5 [28] (using the ClustalW algorithm), followed by a tree reconstruction (distance or neighbour joining method). Using MAUVE and its backbone output file, we calculated the ratio of the size of the core genome to that of the pan-genome to evaluate the closed or open nature of the pan-genome.

We were also interested in determining the lineages of the three African strains. For lineage analysis, we used the MLVA8

TABLE 1. Pan-genomes of human clonal pathogens

Species	Genome used	Lifestyle	Intracellular	Niche	%
<i>Bacillus anthracis</i>	9	Allopatric	No	Soil	99
<i>Rickettsia rickettsii</i>	8	Allopatric	Yes	Ticks	99
<i>Chlamydia trachomatis</i>	20	Allopatric	Yes	Human	99
<i>Rickettsia prowazekii</i>	8	Allopatric	Yes	Human	100

The % column corresponds to the core/pan-genome ratio.

system [10], which is composed of eight VNTR loci: *vrnA*, *vrnB1*, *vrnB2*, *vrnC1*, *vrnC2*, CG3, pXO1-AAT and pXO2-AT [29]. The NCBI and the MLVA databases were also helpful for lineage analysis.

Next, we used OrthoMCL [30] with default parameters to obtain a list of orthologs and determine the pan-genome composition (core, accessory and unique genes) of *B. anthracis*. We also investigated the SNPs present in the core genome by phylogeny, performing a maximum likelihood tree (phym1) with 100 bootstrap iterations. For the core genome tree and the transition/transversion bias, we used MEGA5. Finally, based on the core SNPs tree, we created a time tree based on the Reltime method, developed by Tamura et al. in 2012 [31]. This tree allowed the estimation of the divergence time in millions years and was built using the MEGA 6 software.

Results

General features and phylogeny

For each of the three strains, we obtained more than 6 million reads from the SOLiD sequencing. Average coverage was approximately 30, and maximum coverage could reach 3000. The genomes of the three African *B. anthracis* strains, Sen2Col2, Sen3 and Gmb1, were the same size as the other known strains (5.23 Mb), and they had the same average number of proteins (approximately 5300) and the same G+C% value. The three genomes were deposited at EMBL with the accession numbers CAVC010000000, CAVD010000000 and CAVE010000000, respectively. The MAUVE alignment revealed no rearrangements and a high conservation among all genomes. Examination of the *plcR* gene revealed a nonsense mutation typical to *B. anthracis* [7] at position 640 and the four known prophage regions in the three new strains. The low values of the branches on the phylogenetic tree (not shown) indicated high similarities between the strains. We also examined the *rpoB* gene but could not perform a phylogenetic analysis because the sequences of all nine strains were identical. Regarding the plasmids, we found that pXO1 and pXO2 in the three African strains were the same size (0.18 Mb and 0.094 Mb, respectively) and contained the same

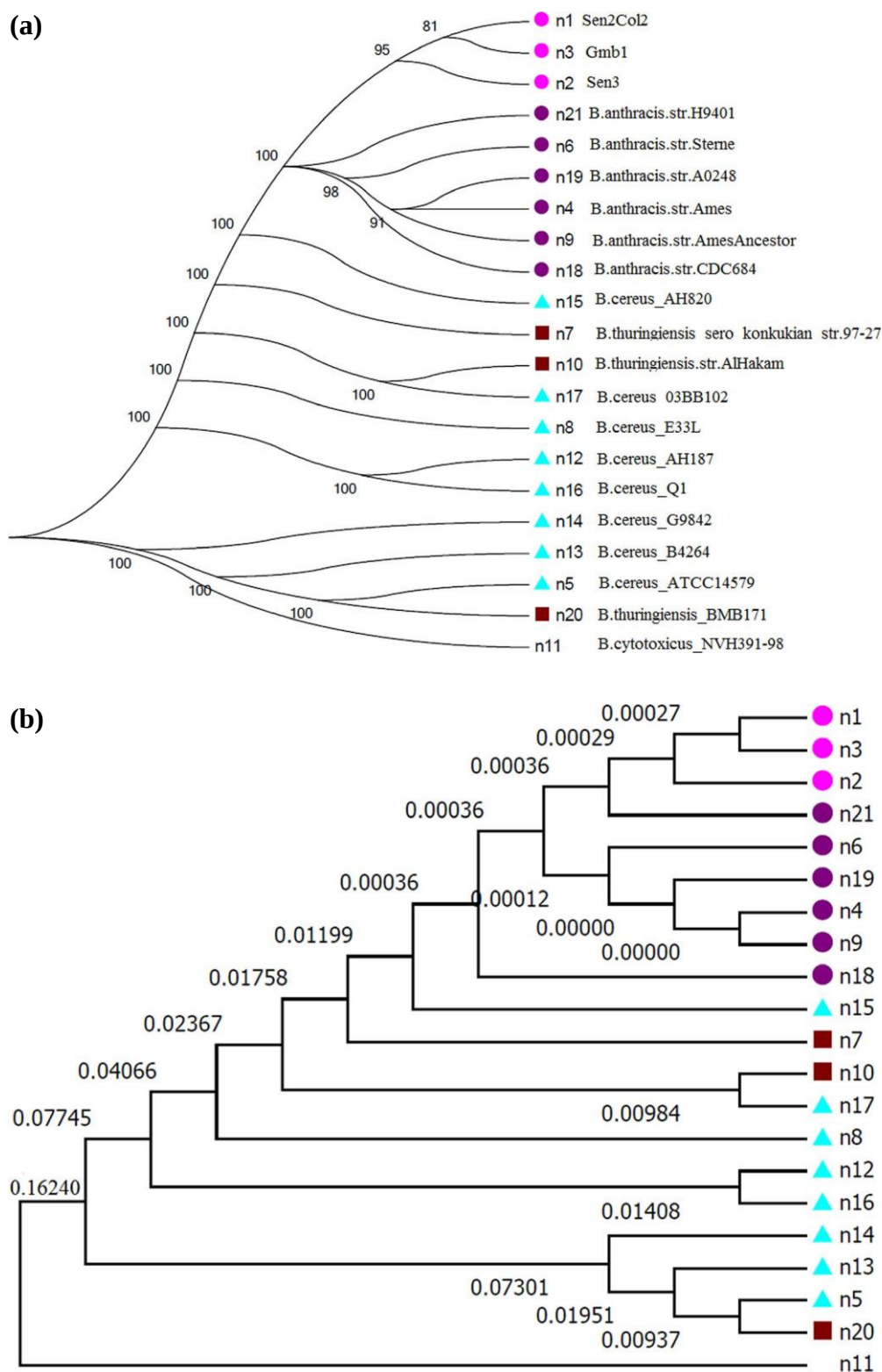


FIG. 6. Single nucleotide polymorphisms of the core content based tree. The percentage on the branches corresponds to bootstraps. This is a PhyML tree with 100 bootstrap iterations. Colours correspond to the species. Purple is *Bacillus anthracis*, pink is our three African *B. anthracis* strains, blue is *Bacillus cereus* and brown is *Bacillus thuringiensis*. (a) Numbers on branches correspond to bootstrap values. (b) Time tree based on the previous tree. Numbers on the branches are the divergence time, given in million years.

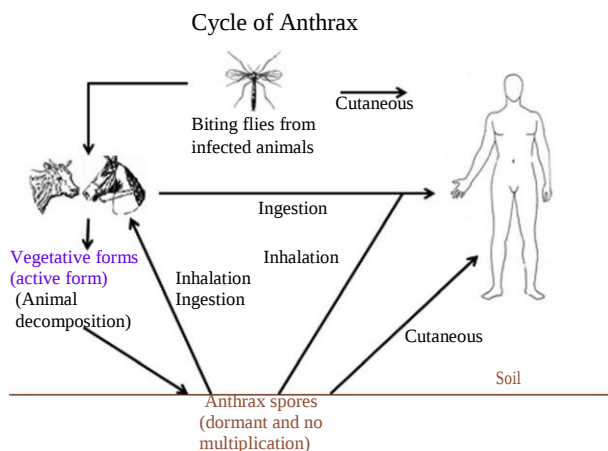


FIG. 7. Summary of the *Bacillus anthracis* lifestyle.

average number of genes (195 and 102, respectively). There were no gaps in the new plasmid sequences. The MAUVE alignments (Fig. 1) illustrate the similarities between the plasmids. The pX01 plasmids from CDC684 and the three African strains exhibit an inversion, and the pX02 plasmids of the three African strains are identical to that of CDC684. Additionally, based on the analysis of the phylogenetic trees (Fig. 2a,b), the two plasmids of the African strains are closely related to those from strain CDC684.

We defined the profile of the eight VNTR loci for the three new strains, and the tree shows that these African strains again clustered with CDC684 (Fig. 3). Using the values of the eight loci and comparing them to the work of Keim et al. [10], we found that the three African strains belong to lineage A. More specifically, we found that these strains belong to lineage A4, the same lineage as CDC684 and one other African strain [10].

Genomic comparison

KEGG and COG. The three African strains are identical to each other and to CDC684 at a functional level. Fig. 4 represents the clustering of the strains based only on the difference in the KEGG distribution. Divergences are as follows: one difference with Sterne (ko02020), two with H9401 (ko03010 and ko00300), and multiple differences with Ames and Ames Ancestor (ko00260, ko00300, ko00440, ko02010, ko02020, ko02040), and A0248 (ko00562, ko01040, ko00300, ko00340, ko00440, ko02010, ko02020, ko02040, ko05100). When we examined these details, we noticed two groups: one group contains A0248, Ames and Ames Ancestor, and the other group contains the other strains. There were no differences between the pX01 and pX02 plasmids of the African strains and those of the other strains (data not shown). We looked in detail at

categories related to the genetic systems for DNA surveillance because they might be a part of the slow evolution of these bacteria. DNA replication and nucleotide excision repair were complete and active. With regard to homologous recombination, the *ruvC* gene is absent in all strains. For mismatch repair, *mutH*, the unique enzyme for the incision step, is absent. Hence, this pathway is incomplete.

The COG data showed similar results. First, as shown in Fig. 5, a cluster with Ames, Ames Ancestor and A0248 (group 1) and another cluster with the other strains (group 2) was found. Moreover, we can see uniformity between the strains inside each of the COG categories, except in the E (amino acid transport and metabolism), G (carbohydrate transport and metabolism), P (inorganic ion transport and metabolism) and M (cell wall/membrane/envelope biogenesis) categories, where there is, for group 1, approximately 5% less protein function as group 2. These small differences can be observed as slight modifications of the colours in Fig. 5.

Pan-genome, SNPs and mobilome. The mobilome was examined, and the same trend was found in all of the strains: two transposases, one or two confirmed CRISPRs and numerous proteins/associated proteins from phages or prophages. We also examined the mobilome in the plasmids. All of the pX01 plasmids contained five transposases, one phage and no CRISPRs. All of the pX02 plasmids contained two transposases and no CRISPRs.

The pan-genome is composed of 2893 core genes, seven unique genes and 85 accessory genes. First, we considered the unique genes. We found five in Sterne (two not found on NCBI, one conserved hypothetical protein, an *EmrB/QacA* family drug resistance transporter and a zinc-binding dehydrogenase), one in CDC684 (not found on NCBI) and one in H9401 (a *yfeT* DNA-binding transcriptional regulator), but all were false positives, as they were eventually identified in other

B. anthracis strains available on the NCBI database. Next, we carefully examined the 85 accessory genes. The three African strains and CDC684 contained almost all of the accessory genes. Half of the accessory genes were annotated as hypothetical proteins. The hierarchical clustering again resulted in the same two groups found using COG and KEGG (one with Ames, Ames Ancestor and A0248 and the second with the other strains). Moreover, we calculated the core/ pan-genome ratio and found that the core genome represented 99% of the pan-genome (Table 1), again indicating the high rate of conservation among the nine strains. Finally, we studied the SNPs at the core genomic level. We found approximately 3800 SNPs between the nine strains, with 2911 in the core. Among the three African strains, there are 1500 SNPs in the core and 1120 among the six reference strains.

We can see that the three African strains cluster together. Moreover, we have a transition/transversion bias of 0.32 between the nine strains. The very small rate of SNPs, low transition/transversion bias and very high ratio of the core genome function to the pan-genome indicates that *B. anthracis* evolves very slowly. To go further, we generated a maximum-likelihood tree based on SNPs of the core of the nine

B. anthracis strains, together with eight *B. cereus*, three *Bacillus thuringiensis* and, as an outgroup, one *Bacillus cytotoxicus*

(Fig. 6a) strain. This tree clearly showed that our three African strains evolved differently from the other six strains of

B. anthracis and that is an ancestral difference. Moreover, we obtained good bootstraps, so we could be confident about this cluster. Finally, we generated a time tree (Fig. 6b) to estimate the divergence time between each cluster. On Fig. 6b, the number on branches are indicated in millions of years. For instance, between the African cluster and *B. anthracis* H9401, the estimated divergence time is approximately 360 years. Moreover, the estimated divergence time between the *B. anthracis* cluster and *B. cereus* AH820 (n15 on Fig. 6b) is approximately 12 000 years. For comparison, in a work in 1999, Achtman et al. first estimated the divergence time between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* to be between 1500 and 20 000 years. Then, in 2004 [32], they looked at different pathovars of *Y. pestis*. They found the estimated divergence time between an *Y. pestis* strain (CO92) and a *Medievalis* strain (KIM) to be approximately 6500 years.

Discussion

In comparing the three African strains to the other *B. anthracis* strains, we noticed that all of the African strains carried the two virulence plasmids (pX01 and pX02), the *plcR* nonsense mutation and four prophages. We also determined that these strains were more closely related to CDC684 at the functional, sequence, plasmid and lineage levels. In this work, we validate the finding that, as previously shown [9], the pan-genome of *B. anthracis* is very narrow and that *B. anthracis* is clonal. To have confidence in our study, we used many different tools to compare and validate our results. All of the tools yielded the same results: the addition of the three African strains did not change the nature of the *B. anthracis* pan-genome (2893 core genes and 85 accessory genes), which had a core/ pan-genome ratio of 99%. This core/pan-genome ratio is very close to those from the other human clonal pathogens (Table 1), such as *Rickettsia rickettsii*. However, there is discordance between the presence of a mobilome (some

phages) and the fact that *B. anthracis* has a closed pan-genome. Nevertheless, *B. anthracis* is derived from the

B. cereus group, a sympatric species that is not intracellular. Therefore, *B. anthracis* may have become entirely allopatric. Moreover, based on the core genome, we found very few SNPs (896), a very small transition/transversion bias (0.32) and no CRISPRs. Hence, we can hypothesize that *B. anthracis* is an ancient clone that evolved slowly. Indeed, the work of Mancini and Ippolito [33] describes the history of anthrax disease and suggested that the first case may date back to antiquity. However, calculating the age of this type of bacterium is difficult due to its life cycle (a short vegetative phase of 20–40 generations and a long spore phase) [9].

Bacillus anthracis does not replicate in the spore phase, and when it is in tissues, it may replicate as a pathogen to avoid living in sympatry. This behaviour is similar to *Clostridium tetani* [34], a sporulating, anaerobic bacterium that resides in the soil and is pathogenic for humans and animals. We recently obtained a new genome of *C. tetani* and found that it is also very close to the reference genome [35]. Therefore, the *B. anthracis* pathogen evolves very slowly compared with other species with similar generation times [18,19]. We believe that the lack of gene transfer and defence mechanisms (CRISPRs) observed in intracellular bacteria [36] suggests that *B. anthracis* multiplies only as a pathogen and that its life in soil is exclusively dormant (Fig. 7).

There are different types of pathogens. Opportunist pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, live in the environment but are not specialized. Real pathogens, such as

B. anthracis, *Y. pestis* [37], *C. tetani* and *Tropheryma whipplei*, are specialized and have a small and closed pan-genome. Each of these pathogens has a core/pan-genome ratio of more than 90%. Real pathogens can survive in the soil or water but cannot multiply outside their niche. A pan-genome study, as opposed to a virulence study, can help to determine if a species is a real, specialized pathogen.

Conclusion

Due to the lengthy spore phase of its life cycle, *B. anthracis* evolved very slowly and has a very narrow pan-genome, despite its apparent soil ecological niche. We found that the three African strains examined belong to lineage A (worldwide lineage), specifically lineage A4, similar to CDC684 and another previously characterized African strain. Pan-genome analysis allowed us to assess the lifestyle of this pathogen and confirmed its allopatric, highly specialized lifestyle. Our studied African strains diverged very recently from the other *B. anthracis* strains.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Scarlata F, Colletti P, Bonura S, Trizzino M, Giordano S, Titone L. The return of anthrax. From bioterrorism to the zoonotic cluster of Sciacca district. *Infez Med* 2010; 18: 86–90.
- 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.
- Koehler TM. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 386–396.
- Sweeney DA, Hicks CW, Cui X, Li Y, Eichacker PQ. Anthrax infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 1333–1341.
- Imperiale MJ, Casadevall A. Bioterrorism: lessons learned since the anthrax mailings. *MBio* 2011; 2: e00232–11.
- Rasko DA, Worsham PL, Abshire TG et al. *Bacillus anthracis* comparative genome analysis in support of the Amerithrax investigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 5027–5032.
- Slamti L, Perchat S, Gominet M et al. Distinct mutations in *PlcR* explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol* 2004; 186: 3531–3538.
- Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* 2007; 2: e461.
- Keim P, Gruendike JM, Klevytska AM, Schupp JM, Challacombe J, Okinaka R. The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 397–405.
- Keim P, Price LB, Klevytska AM et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 2000; 182: 2928–2936.
- Read TD, Salzberg SL, Pop M et al. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 2002; 296: 2028–2033.
- Ravel J, Jiang L, Stanley ST et al. The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames “Ancestor”. *J Bacteriol* 2009; 191: 445–446.
- Chun JH, Hong KJ, Cha SH et al. Complete genome sequence of *Bacillus anthracis* H9401, an isolate from a Korean patient with anthrax. *J Bacteriol* 2012; 194: 4116–4117.
- Charrel RN, La SB, Raoult D. Multi-pathogens sequence containing plasmids as positive controls for universal detection of potential agents of bioterrorism. *BMC Microbiol* 2004; 4: 21.
- Le Minor L, Veron M. *Bacillus anthracis* in *Bacteriologie medicale*, Flammarion, coll, Paris: Medecine Sciences Publications, 1989; 54.
- Read TD, Peterson SN, Tourasse N et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 2003; 423: 81–86.
- Okinaka RT, Price EP, Wolken SR et al. An attenuated strain of *Bacillus anthracis* (CDC 684) has a large chromosomal inversion and altered growth kinetics. *BMC Genomics* 2011; 12: 477.
- Sun S, Chen J, Li W et al. Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D546–D551.
- Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV et al. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 22–28.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 29–34.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: W182–W185.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008; 9: 75.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: W52–W57.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: W347–W352.
- Saeed AI, Sharov V, White J et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003; 34: 374–378.
- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC et al. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 2006; 411: 134–193.
- Darling AE, Mau B, Perna NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 2010; 5: e11147.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28: 2731–2739.
- Pearson T, Busch JD, Ravel J et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13536–13541.
- 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.
- Tamura K, Battistuzzi FU, Billing-Ross P, Murillo O, Filipski A, Kumar S. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 19333–19338.
- Achtman M, Morelli G, Zhu P et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17837–17842.
- Mancini R, Ippolito G. Anthrax and carbuncle: two sides of the same coin. *Infez Med* 2003; 11: 108–113.
- Bruggemann H, Baumer S, Fricke WF et al. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1316–1321.
- Fournier P-E, Levy P-Y, Million M et al. Genome of a chronic osteitis-causing *Clostridium tetani*. *New Microbes New Infect* 2014; 2: 25–26.
- Pourcel C, Drevet C. Occurrence, diversity of CRISPR-Cas systems and genotyping implications. In: Barrangou R, Van der Oost J ed.. *CRISPR-Cas Systems: RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea*. Berlin: Springer-Verlag, 2013; 33–59.
- Eppinger M, Worsham PL, Nikolich MP et al. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. *J Bacteriol* 2010; 192: 1685–1699.

ANNEXE III

Logigramme protocole PCR sur CFX – 96 Bio Rad pour identification de germes
hautement contagieux : cas de *Bacillus anthracis*

Fédération de Microbiologie Clinique Pr. Raoult Pr Drancourt Pr. Lascola Secteur « Crises en maladies infectieuses »		PO5/BIO/CFX-96 YEN1
Logigramme protocole PCR sur CFX-96 Bio Rad		
Date de création : 01/12/2011	Rédigé par : E.N Guyen	
Date de révision :	Approuvé par : B.La Scola	
Nombre de pages : 2	Version : 0	

Ce protocole fait suite des protocoles d'extraction de germes hautement contagieux.
Il existe trois types de MIX PCR :

MIX PROBE		
Matériel: Congélateur N°13 à droite du couloir de l'URMITE, bac de gauche sortir de la boîte « réactifs, amorces, sondes » un tube de : H2O Probe Super master mix UDG Amorces R Amorces S sonde		
	MIX pour 1 échantillon	MIX pour 9 échantillons
H2O	4 µl	36 µl
UDG	0.5 µl	4.5 µl
MIX	10 µl	90 µl
Amorce S	0.5 µl	4.5 µl
Amorce R	0.5 µl	4.5 µl
Sonde	0.5 µl	4.5 µl
Volume total MIX par puit	16 µl DANS BOX ADN	FREE box geche
Volume d'extrait	+ 4 µl	BOX DE DROITE

1	PUR
2	1/10
3	1/100
4	NEG EXTRACTION
5	POS
6	NEG
7	NEG
8	NEG

I. MISE EN MARCHÉ DE L'INSTRUMENT ET DE L'ORDINATEUR

COPIE AUTORISÉE

- 1- Allumer l'instrument (bouton POWER situé en arrière à droite).

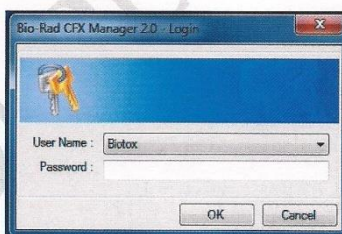


- 2- Allumer l'ordinateur (et l'écran)

Ouvrir le logiciel Bio-rad CFX Manager

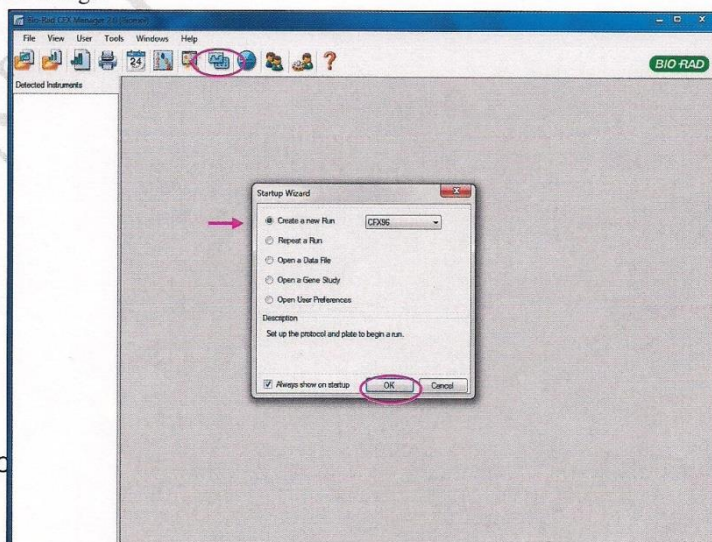
User Name : **Biotox** / password : pas de password

Il existe une session Biotox uniquement sur les CFX 1(1^{ère} pièce Biomol.) et CFX 2 (2^{ème} pièce Biomol.).



La page d'accueil du logiciel **Bio-Rad CFX Manager 2.0** s'ouvre.

Sélectionner « **Create a new Run** » et CFX96 et cliquer sur **OK**. Ou cliquer dans la barre des tâches sur le logo.



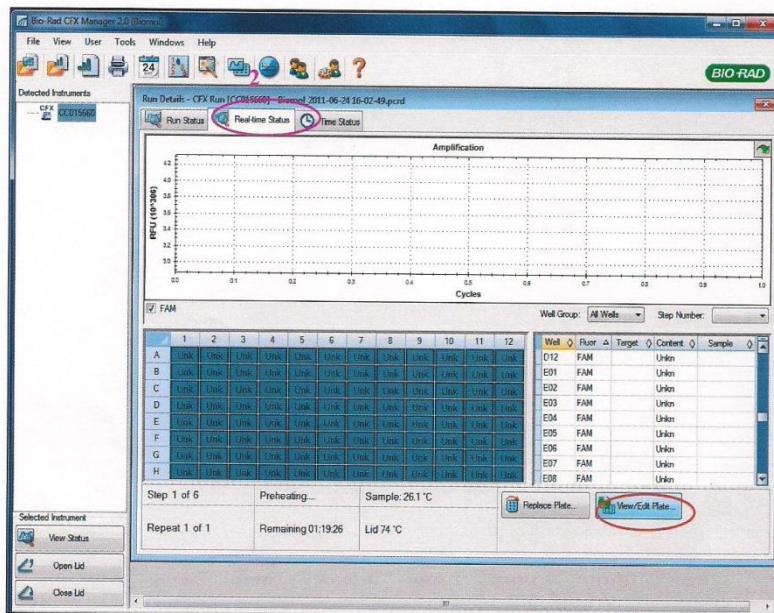
Le run se lancera dès que la température du bloc est bonne.

COPIE AUTORISÉE

III. RENTRER LE PLAN DE PLAQUE

Pendant que le run fonctionne, on va **rentrer le plan de plaque**, en se positionnant dans la partie **Real-time Status**.

Cliquer sur
View/Edit Plate.



La fenêtre **Plate Editor** s'ouvre. On visualise le plan de plaque simple.

Méthode pour rentrer son plan de plaque

Cliquer sur **Tools**

Puis

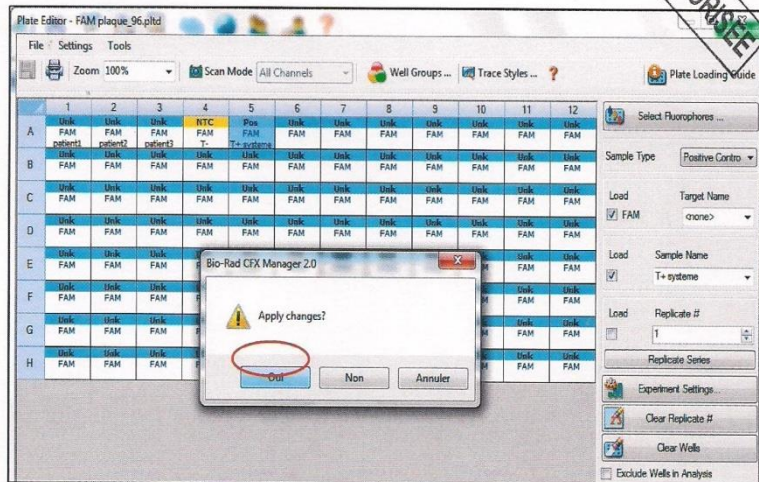
Spreadsheet View.

Row	Column	Sample Type	Replicate #	Target Name	Sample Name	Starting Quantity	Units
A	1	Unknown			patient1	N/A	copy number
A	2	Unknown			patient2	N/A	copy number
A	3	Unknown			patient3	N/A	copy number
A	4	Unknown			T+	N/A	copy number
A	5	Unknown				N/A	copy number
A	6	Unknown				N/A	copy number
A	7	Unknown				N/A	copy number
A	8	Unknown				N/A	copy number
A	9	Unknown				N/A	copy number
A	10	Unknown				N/A	copy number
A	11	Unknown				N/A	copy number
A	12	Unknown				N/A	copy number
B	1	Unknown				N/A	copy number
B	2	Unknown				N/A	copy number
B	3	Unknown				N/A	copy number
B	4	Unknown				N/A	copy number
B	5	Unknown				N/A	copy number
B	6	Unknown				N/A	copy number
B	7	Unknown				N/A	copy number
B	8	Unknown				N/A	copy number
B	9	Unknown				N/A	copy number
B	10	Unknown				N/A	copy number

PO5/BIO/CFX-96Protocol

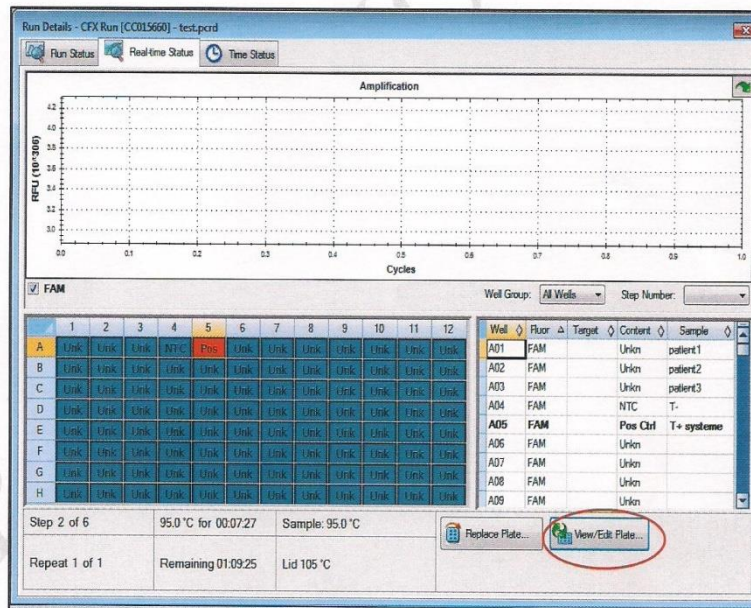
COPIE AUTORISÉE

Une fenêtre de confirmation des modifications de la plaque apparaît. Cliquer sur **Oui**

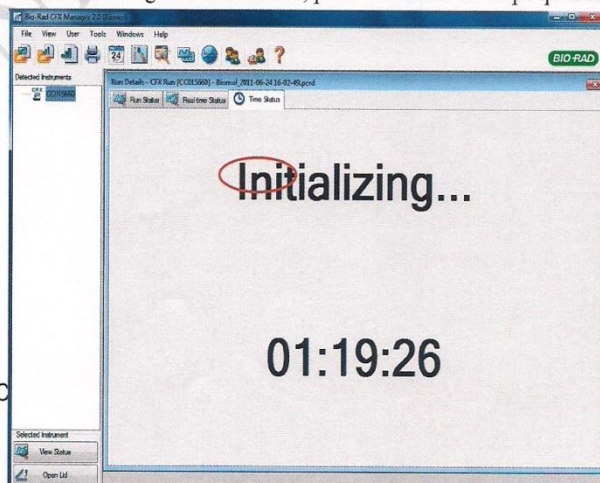


La fenêtre **Run Details** réapparaît avec le nouveau plan de plaque.

Si on a commis une erreur sur ce plan, de nouveau on peut cliquer sur **View/Edit Plate** pour faire des modifications.



On peut se rendre sur l'onglet **Time Status**, pour visualiser le temps qu'il reste au run.



PO5/BIO/C

AUTORISEE

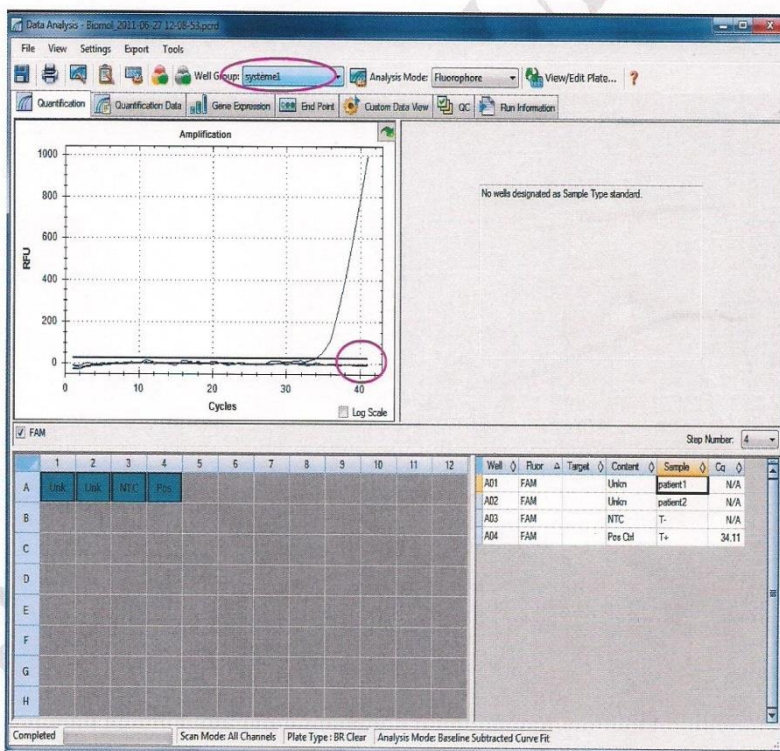
IV- LIRE LE RESULTAT D'UN RUN

A la fin du run, la fenêtre de résultat s'ouvre automatiquement.

Sinon cliquer File / Open / Data File, et ouvrir le run d'intérêt.

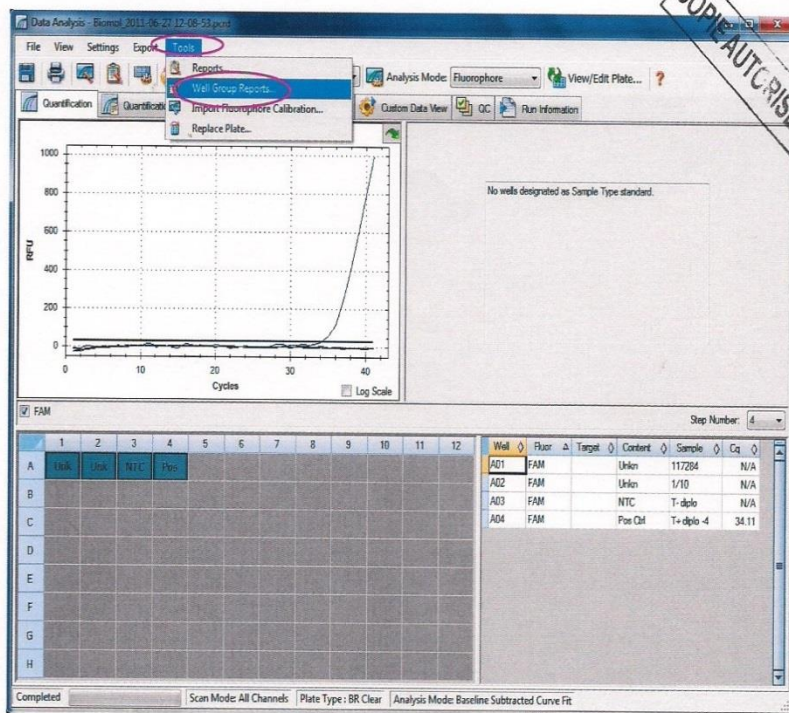
Travailler chaque système indépendamment, en sélectionnant le groupe avec le menu déroulant si celui-ci a été créé.

Bouger la ligne de base directement.



V- IMPRIMER LES RESULTATS

Quand tous les groupes ont été analysés cliquer sur **Tools puis choisir Well Group Report s**



Sélectionner le groupe crée.

Remarque : Décocher All Wells, pour éviter d'avoir un rapport qui reprend tous les groupes.

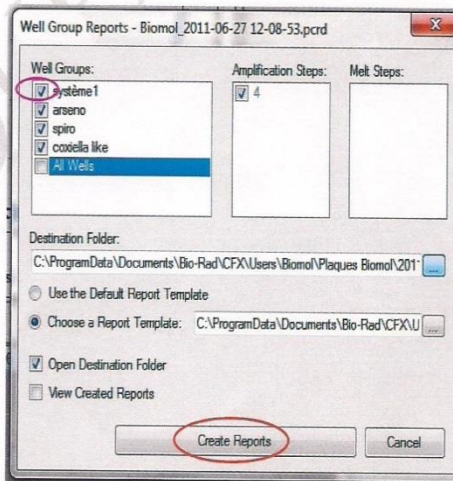
Cliquer sur **Create Reports**.

Les PDF vont se créer automatiquement dans le dossier résultats Biotox / 2011 / mois. (c'est le même chemin que pour les enregistrements de run)

Copier / Coller les PDF à imprimer dans sa clé USB.

Quand tout le travail est terminé, fermer le logiciel, l'ordinateur et l'appareil.

Imprimer les résultats..



ANNEXE IV

Tableaux relatifs aux résultats PCR des souches Sénégalaises et Gambienne
Souche N 899 – SEN1

Biotox_2012-03-13 12-35-57-btx130312.pcrd 3/13/2012 1:58 PM Report Information User:
BioRad/Biotox Data File Name: 2_Biotox_2012-03-13 12-35-57-btx130312.pcrd Data File Path:
C:\ProgramData\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\Biotox\Resultats Biotox\2012\03- Mars Well
Group Name: All Wells Report Differs from Last Save: No Run Setup Run Information Run User:
Biotox Run Date: 3/13/2012 12:36 PM ID: Notes: Sample Volume: 20 Temperature Control Mode:
Calculated Lid Temperature: 105 Base Serial Number: CC015660 Optical Head Serial Number:
785BR6296 Les éléments en rouge correspondent aux numéros des échantillons testés dans le
cadre notre étude et suivant le tableau n°3 et correspondant à la plaque 1

Tableau 3 : Résultats PCR obtenus après lecture de la plaque n°1

[illegible]

Souche N°900 Sen 2

Report Information

User: BioRad/Biotox Data File Name: 2_Biotox_2012-03-13 12-35-57-btx130312.pcrd Data File
Path: C:\ProgramData\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\Biotox\Resultats Biotox\2012\03- Mars
Well Group Name: All Wells Report Differs from Last Save: No B1

C1

Run Setup

Run Information

Run User: Biotox Run Date: 3/13/2012 12:36 PM ID: Notes: Sample Volume: 20 Temperature
Control Mode: Calculated Lid Temperature: 105 Base Serial Number: CC015660 Optical Head
Serial Number: 785BR6296

Protocol

1: 50.0°C for 2:00
2: 95.0°C for 15:00
3: 95.0°C for 0:01
4:60. Read
5: GOTO 3, 39 more times
6: 45.0°C for 0:30
Plate Display **Figure n°14 : Echantillon N°899 – SEN 1**

Quantification

Step #: 4 Analysis Mode: Fluorophore Cq Determination: Single Threshold Baseline Method:
FAM: Auto Calculated Threshold Setting: FAM: 151.29, Auto Calculated

Report Information

User: BioRad/Biotox Data File Name: 2_Biotox_2012-03-13 12-35-57-btx130312.pcrd Data File
Path: C:\ProgramData\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\Biotox\Resultats Biotox\2012\03- Mars
Well Group Name: All Wells Report Differs from Last Save: No

Run Setup

Run Information

Run User: Biotox Run Date: 3/13/2012 12:36 PM ID: Notes: Sample Volume: 20 Temperature
Control Mode: Calculated Lid Temperature: 105 Base Serial Number: CC015660 Optical Head
Serial Number: 785BR6296

Protocol Les éléments en rouge correspondent aux numéros des échantillons testés dans le cadre
notre étude et figurent dans le tableau n°4 correspondant à la plaque n°2.

Tableau 4 : Résultats PCR obtenus après lecture de la plaque n°2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk FAM 124218 99-pur	Unk FAM 124219 00- 1/100	Unk FAM 124219 02-1/10	Neg FAM t-	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM
B	Unk FAM 124218 99-1/10	Unk FAM sen2cp- pur	Unk FAM 124219 02- 1/100	Neg FAM t-	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM
C	Unk FAM 124218 99- 1/100	Unk FAM sen2cp- 1/10	Unk FAM 124219 05-pur	Pos FAM t+	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM
D	Unk FAM sen1cp- pur	Unk FAM sen2cp- 1/100	Unk FAM 124219 05-1/10	Pos FAM t+	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM
E	Unk FAM sen1cp- 1/10	Unk FAM 124219 01-pur	Unk FAM 124219 05- 1/100	Neg FAM t-	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM
F	Unk FAM sen1cp- 1/100	Unk FAM 124219 01-1/10	Unk FAM 124219 06-pur	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM
G	Unk FAM 124219 00-pur	Unk FAM 124219 01- 1/100	Unk FAM 124219 06-1/10	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM
H	Unk FAM 124219 00-1/10	Unk FAM 124219 02-pur	Unk FAM 124219 06- 1/100	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM	Unk FAM

Quantification

Step #: 4 Analysis Mode: Fluorophore Cq Determination: Single Threshold Baseline Method:
FAM: Auto Calculated Threshold Setting: FAM: 151.29, Auto Calculated

Les résultats de l'amplification sont interprétés à la suite des différents signaux observés sont consignés dans la figure n°15 suivante

Souche N°901 Sen 3

Report Information Les éléments en rouge correspondent aux numéros des échantillons testés dans le cadre notre étude et figurent dans le tableau n°5

Tableau 5 : Résultats PCR obtenus après lecture de la plaque n°3

[illegible]

Run Setup

Run Information

Run User: Biotox Run Date: 3/13/2012 12:36 PM ID: Notes: Sample Volume: 20 Temperature Control Mode: Calculated Lid Temperature: 105 Base Serial Number: CC015660 Optical Head Serial Number: 785BR6296

Step #: 4 Analysis Mode: Fluorophore Cq Determination: Single Threshold Baseline Method: FAM: Auto Calculated Threshold Setting: FAM: 151.29, Auto Calculated

Les résultats de l'amplification sont interprétés à la suite des différents signaux observés sont consignés dans la figure n°16 suivante

Souche N°902 GMB 1

User: BioRad/Biotox Data File Name: 2_Biotox_2012-03-13 12-35-57-btx130312.pcrd Data File Path: C:\ProgramData\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\Biotox\Resultats Biotox\2012\03- Mars Well Group Name: All Wells Report Differs from Last Save: No Run Setup Run Information Les éléments en rouge correspondent aux numéros des échantillons testés dans le cadre notre étude et figurent dans le tableau n°6 correspondant à la plaque n°Run User: Biotox Run Date: 3/13/2012 12:36 PM ID: Notes: Sample Volume: 20 Temperature Control Mode: Calculated Lid Temperature: 105 Base Serial Number: CC015660 Optical Head Serial Number: 785BR6296 Quantification Step #: 4 Analysis Mode: Fluorophore Cq Determination: Single Threshold Baseline Method: FAM: Auto Calculated Threshold Setting: FAM: 151.29, Auto Calculated

Tableau 6 : Résultats PCR obtenus après lecture de la plaque n°4

[illegible]

ANNEXE V

Procédé de Séquençage par la méthode de SANGER

Extraction de l'ADN pour séquençage du génome

Après purification des bactéries, reprise du culot final en **TE**.

Pour 1 ml de suspension, ajouter : 1% de **SDS** soit 100 µl de SDS à 10%

50 µg de **RNase** soit 100 µl de RNase à 500 µg/ml

Incuber 1h dans BM 37°C, remettre 50 µg de Rnase et re-incuber 1h à 37°C

ajouter 250 µg de **PK** soit 10 µl de PK à 25 mg/ml

Incuber **O/N** dans BM 37°C

Extraction par le **phénol chloroforme alcool isoamylique** sur tube «Phase Lock Gel Heavy » jaune (Eppendorf) (**protocole de référence** : sera appliqué -sauf modification particulière- à toute précipitation à l'alcool et ne sera donc pas re-écrit systématiquement)

Prévoir 3 tubes par 500 µl de suspension

Centrifuger les tubes pour culoter la graisse 1 min à 10000 t/min à 20-25°C

Par tube mettre 500 µl de suspension + 500 µl de phénol chlo. al. isoamyl.

Ne pas vortexer mais agiter par retournement énergiquement

Centrifuger 5 min à 8000 t/min à 20-25°C

Récupérer la phase aqueuse (au-dessus de la graisse) avec un cône coupé, la mettre dans un second tube avec 500 µl de phénol chlo. al. isoamyl.

Centrifuger 5 min à 8000 t/min à 20-25°C

Recommencer l'opération une 3^{ème} fois

Récupérer la dernière phase aqueuse dans un tube Eppendorf

Précipitation à l'alcool (**protocole de référence** : sera appliqué -sauf modification particulière- à toute précipitation à l'alcool et ne sera donc pas re-écrit systématiquement)

Par tube, pour 500 µl de phase aqueuse, ajouter :

1 µl de glycogène à 20 mg/ml (aliquoté et conservé à -20°C)

agiter par retournement

0.2 vol d'acétate d'ammonium 10M (conservé à 4°C) soit 100 µl

agiter par retournement

2 vol d'éthanol absolu (conservé à -20°C) soit 1000 µl

agiter par retournement

Laisser minimum 2 h (et jusqu'à O/N) à -20°C

Centrifuger 30 min à 8000 t/min à 4°C

Éliminer le surnageant par retournement

Laver le culot avec 1000 µl d'alcool à 70° (conservé à -20°C)

Centrifuger 20 min à 8000 t/min à 4°C

Éliminer le surnageant par retournement (absorber les dernières gouttes avec un papier absorbant)

Après avoir injecté complètement l'échantillon (c'est-à-dire avoir fait 2 fois input, le piston est alors complètement en bas), **il y a généralement une bulle dans la seringue** ; au lieu de mettre le bouton sur output, le mettre en position verticale, cliquer sur OK, le piston remonte, la bulle remonte en fin de course ; quand elle arrive en haut, mettre le bouton sur output.

A la demande de l'appareil « y a-t-il une bulle dans la seringue ? », toujours répondre non !

➡ A la fin, récupérer l'échantillon dans un autre tube stérile (= THS).
En prendre 2 µl pour le dépôt sur gel.

* Préparation de l'échantillon d'ADN à injecter

Vol de l'échantillon : en fonction de sa concentration, diluer l'ADN génomique avec du TE qsp 200 µl.

Centrifuger 5 min à 13000 t/min. Même si on ne voit aucun culot, reprendre le surnageant dans un autre tube .

** Conditions de fragmentation

<u>Code</u> : à titre indicatif	Code 13 = de 2 à 3 kb
	Code 15 = de 3 à 5 kb
	Code 16 = de 5 à 8 kb
	Code 17 = de 8 à 12 kb

Ces valeurs peuvent varier d'un capillaire à l'autre. Donc, pour chaque nouveau capillaire mis en place, noter son n° et ses résultats.

Si on doit faire plusieurs codes différents, commencer par le code de plus grande taille.

➡ En attendant le résultat du gel de contrôle, faire 2 rinçages à l'eau tiède selon la procédure suivante :

Quand l'appareil demande si on veut faire les lavages, répondre non,
fermer le protocole,
revenir au départ pour modifier les paramètres des lavages,
revenir sur Edit Wash Scheme,
entrer : HCl 0,2M : 2
tout le reste : 0

Start

Continuer normalement selon instructions.

➡ Quand les fragmentations sont validées par le gel, faire un lavage complet de l'appareil. Il faut donc re-éditer les valeurs des lavages.
Pour cela, quand l'appareil demande si on veut faire les lavages, répondre non,
fermer le protocole,

revenir au départ,

revenir sur Edit Wash Scheme et remettre les valeurs :	HCl 0.2M : 4
	H ₂ O + NaOH : 4
	ED (ou TE) : 4

Start

Quand ce lavage est fini, fermer le protocole.

Contrôle sur gel d'agarose à 0.7% en TBE 0.5X

Marqueur Raoul 8 µl

2 µl d'ADN « avant HS » + 6µl de TE/bleu : déposer la totalité

2 µl d'ADN « après HS » + 6µl de TE/bleu : déposer la totalité

Marqueur Raoul 8 µl

Migration à 100 V pendant 30 min (et plus si nécessaire)

Précipitation à l'alcool de l'ADN fragmenté (voir proto de référence)

On travaillera sur le culot sec pour l'étape suivante.

Réparation

A chaque code d'hydroshear correspond un enrichissement en une taille d'insert.

On engagera au moins 20 µg d'ADN pour une taille d'insert, 40 µg pour 2 tailles d'insert.

Pour une taille d'insert (c'est à dire 20 µg), on reprend le culot sec avec 81 µl d'ED

+ 10 µl de tampon de l'enzyme 10X

+ 20 nM (final) de **dNTP** soit 2 µl de sol mère contenant 10 µl de chaque nucléotide à 100 mM
+ 60 µl d'eau

+ 5 µg (final) de BSA soit 0.5 µl de BSA à 10 µg/µl

+ 7 µl **T4 polymérase** (Biolabs)

= 100 µl

Incuber 20 min à 12°C (dans appareil PCR ou cryostat ou BM dans la chambre froide)

Inactivation de l'enzyme par le **phénol chlo al iso** :

aux 100 µl de la suspension de réparation, ajouter 50 µl de TE

+ 150 µl de phénol chlo al iso

2 fois au lieu de 3

Précipitation à l'alcool (classique)

On travaillera sur le culot sec pour l'étape suivante.

Ligation adaptateurs

Pour une taille d'insert (20 µg), on reprend le culot sec avec 31.5 µl d'ED

+ 4 µl tampon ligase 10X

+ 2 µl **ligase**

+ 2.5 µl **adaptateurs BstX1** (18 µg réhydratés avec 20 µl d'ED 5 min dans la glace [le noter sur le tube])

= 40 µl

Incuber **O/N** à 16°C

Attention : vérifier toujours la concentration du tampon et la température de travail de l'enzyme qui peuvent varier suivant le fournisseur.

Migration sur gel préparatif

Préparation du gel

➡ Toute la verrerie utilisée et toutes les solutions doivent avoir été **autoclavées**.
Les cuves, peignes, supports, en fait tout ce qu'il n'est pas possible d'autoclaver, sont **rincés à l'HCl 0.25 N**, puis **à l'ED stérile**, puis **à l'éthanol à 100%**.

Préparer un gel « Seaplaque GTG agarose » (Tebu-bio) à 0.7% en TBE 1X :

Verser peu à peu, à froid, les 0.28 g d'agarose dans les 40 ml de TBE, tout en agitant (soit avec une spatule, soit sur un agitateur magnétique). Marquer le niveau. Chauffer progressivement (sans faire bouillir) au micro-ondes. Vérifier le niveau.

Couler 35 ml de gel. Prévoir éventuellement un second gel pour dépôt du marqueur.

Tout ceci peut être préparé la veille ; conserver alors le gel, recouvert de quelques ml de TBE, toute la nuit à 4°C.

Migration

Mettre le gel dans la cuve avec 250 ml de TBE 1X
Ajouter 4 µl de bleu de charge (10X) dans les 40 µl de mélange de ligation.
Déposer dans le(s) puits.

Migration : 30 V pendant 30 min puis + 10 V toutes les 30 min jusqu'à 80 V 30 min
Possibilité de laisser en attente à 10 V pendant 1 à 2 h
Vérifier que le bleu vient juste de sortir du gel

Coloration au Sybr Green

5 µl de Sybr Green dans 50 ml de TBE 1X
Sur agitateur rotatif, à t° du labo, dans le noir (papier alu) pendant 40 min
Lecture et découpe sur une plaque de verre posée sur le Dark Reader (UV de longueur d'onde particulière qui préserve l'ADN)

→ Port des gants et des lunettes spéciales obligatoire

Découpe

Repérer la zone d'enrichissement en inserts, la pré-découper (au scalpel) sous les UV, éteindre les UV, et découper de haut en bas des bandes d'environ 2 mm. Mettre chacune d'elles dans un tube identifié (bactérie, code, taille approximative de l'insert, n° de la bande, date...).

Photographier le gel restant après découpe.

Attention : une fois le gel passé sur les UV, l'ADN sera dégradé, il ne sera plus possible de découper d'autres bandes.

Il est possible de congeler les bandes à -20°C jusqu'à traitement.

Extraction des inserts

A / Technique à la β agarase

(avec extraction phénol chlo al iso)

Préparation du tampon MEN

Composition : MES 20 mM
 EDTA 5 mM
 NaCl 150 mM

Solutions mères : MES 1M → 1 ml (vérifier qu'elle n'ait pas précipité)
 EDTA 0.5M → 0.5 ml
 NaCl 4M → 1.875 ml
 qsp 50 ml d'ED

Le filtrer.

Mode opératoire

Rincer les blocs 3 fois 10 min en tampon MEN, sur la roue.

Les faire fondre à 68°C 5 min (10 min maxi)

Laisser tempérer 2-3 min à 42°C . Mesurer (à la pipette) le volume de fonte

Ajouter la β agarase : 2 μl pour 100 μl d'échantillon

Incuber à 42°C , 2 h minimum et jusqu'à O/N

(Si on laisse plus de 2 h, rajouter 1 μl de β agarase par 100 μl de suspension)

Centrifuger 5 min à 10000 t/min (centrifugée à 20°C)

Prélever le surnageant

S'il reste un culot d'agarose, recommencer idem sur ce culot

Si OK, **extraction phénol chlo al iso** :

2 fois phénol chlo al iso par échantillon (sur tube de graisse)

1 fois chloroforme (dans tube Eppendorf)

Pour récupérer la dernière phase aqueuse, il est préférable de retirer à la pipette le chloroforme au fond du tube ; on transvase ensuite la phase aqueuse dans un autre tube et on laisse s'évaporer sous la hotte chimique (environ 10 min) les dernières traces de chloroforme.

Précipitation à l'alcool (voir proto de réf)

(Adapter tous les volumes au volume de la phase aqueuse)

On reprend le culot sec avec 10 µl d'ED

Estimation de la quantité d'insert par dépôt sur gel d'agarose 0.7% en TBE 0.5X

Marqueur Raoul 8 µl

2 µl d'ADN + 6 µl de TE/bleu : déposer la totalité

Migration à 100 V, 1^{ère} lecture à 5 min, puis + 15 min...

Extraction des inserts

B / Technique avec kit QIAGEN « QIAquick Gel Extraction Kit »

Penser à tarer les tubes dans lesquels on va récupérer les bandes d'agarose.

Les re-peser après pour en connaître le poids.

Mettre 3 vol de réactif **QG** pour 1 vol d'agarose (µl / mg)

Faire fondre au BM à 50°C pendant environ 10 min en surveillant et vortexant toutes les 2 ou 3 min

➤ Si on travaille avec des inserts de **plus de 4 kb**, ajouter 1 vol d'**isopropanol**.

Déposer sur les colonnes

➤ **poids maxi par colonne : 400 mg** ; si supérieur à 400 mg, répartir sur 2 colonnes

➤ **volume maxi par colonne : 800 µl** ; si plus de 800 µl, centrifuger une 1^{ère} fois et déposer le reste par dessus

Centrifuger 1 min à 13000 t/min

Éliminer l'éluat

Laver avec 750 µl de **PE**

Centrifuger 1 min à 13000 t/min

Éliminer l'éluat

Centrifuger une dernière fois pour éliminer les dernières gouttes

Mettre les colonnes dans un tube Eppendorf

Eluer avec 50 µl d'ED préchauffée à 65°C

Centrifuger 1 min à 13000 t/min

Dépôt sur gel d'agarose 0.7% en TBE 0.5X

Marqueur Raoul 8 µl

2 µl d'ADN + 6 µl de TE/bleu : déposer la totalité

Migration à 100 V, 1^{ère} lecture à 5 min, puis + 15 min...

Ligation insert / vecteur

Les différents vecteurs

pCDNA taille : 2.9 kb résistance à la [carbenicilline](#)
Pour « petits » inserts (de 0.5 à 6 kb)

pCNS taille : 2.3 kb résistance au [chloramphenicol](#)
Pour « grands » inserts (de 6 à 14 kb)

Ligation

Théoriquement, engager environ 3 inserts pour 1 vecteur

C'est à dire pour 20 ng de vecteur, engager 60 ng d'insert

En réalité, pour 20 ng de vecteur, engager 300 ng d'insert pour le pCDNA
600 ng d'insert pour le pCNS

Dans un tube Eppendorf, mettre :

DNA qsp 300 ou 600 ng *

Vecteur qsp 20 ng **

Ligase 1 µl

Tampon ligase (10X) qsp 1X

* les inserts non utilisés sont étiquetés et stockés à -20°C dans la boîte appropriée

** la quantité de vecteur peut être baissée à 10 ng pour des rendements d'insert à peine visible sur le gel (cf p.6)

Incuber O/N à 16°C

(Attention : vérifier toujours la concentration du tampon et la température de travail de l'enzyme qui peuvent varier suivant le fournisseur)

Ou **O/WE** à 4°C (dans ce cas, laisser le tube se tempérer 2 h minimum sur la paillasse avant l'électroporation)

En fonction des résultats des transformations, on peut réajuster les mélanges de ligation : refaire avec d'autres ratios V/I, ajouter le reliquat d'insert, etc...

→ Les ligations non utilisées ainsi que les reliquats des ligations après transfo sont identifiés et stockés à -20°C. Attention de bien les différencier des inserts !

Transformation des cellules compétentes

Electroporation

Préparation des solutions mères

Ampicilline	100 mg/ml dans l'ED alicoté par 500 µl et conservé à -20°C
Carbenicilline	100 mg/ml dans l'ED alicoté par 500 µl et conservé à -20°C
Chloramphenicol	12.5 mg/ml dans <u>l'éthanol</u> (conserver à -20°C mais ne pas alicoter car les petits volumes s'évaporent rapidement)

Xgal	80 mg /ml en <u>diméthylformamide</u>
-------------	---------------------------------------

→ Travailler le diméthylformamide sous la hotte chimique
Utiliser un tube Nunc (et non un tube Falcon, attaqué par le diméthylformamide)
et l'envelopper de papier alu pour le conserver (à -20°C) à l'obscurité.

Préparation des boîtes de 2YT agar

Préparer des flacons de milieu 2YT agar et de bouillon 2YT (pour plus tard).
Les autoclaver.

Couler des boîtes de Petri carrées (120x120) (Il faut minimum 50 ml de milieu par boîte) :
Dans le milieu à environ 50°C, ajouter :

- l'antibiotique à la concentration finale de 100 µg/ml
- l'Xgal à la concentration finale de 80 µg/ml

soit **n µl** d'antibio et de Xgal pour **n ml** de milieu

Homogénéiser (attention aux bulles !). Couler.

Préparation du matériel

Dans un bac à glace, prévoir :

- les cuvettes d'électroporation (déjà refroidies par stockage au frigo)
- les tubes de ligation
- les cellules compétentes E.Coli DH10B : 1 tube de 100 μ l = 2 transformations (les sortir au dernier moment quand tout est installé, elles ne doivent pas attendre... et dès leur sortie de -80°C, les mettre tout de suite dans la glace)
- le milieu SOC froid (penser à le décongeler à l'avance si stocké à -80°C)
- des tubes Eppendorf (ou/et des tubes de 10 ml) stériles
- un tube d'ED

Electroporateur

Avec le bouton Settings, cocher Bactérial et avec les flèches faire défiler le menu sur l'écran jusqu'à EC3 (= E. Coli 3 kv)

Avec le bouton Measurements, cocher Time : EC3 est alors remplacé par 0.00 [Mode opératoire](#)

Dans la cuvette à électroporation (attention à l'orienter encoche à gauche c'est-à-dire côté électrode), mettre 0.5 à 1 μ l de ligation (*ou 1/10 de ligation sans dépasser 3 μ l*)
+ 49 μ l de cellules compétentes

Mélanger en tapotant sur le plan de travail

Laisser **en contact entre 3 et 5 min dans la glace**

Pendant ce temps, préparer la pipette de 1000 μ l dans le tube de SOC refroidi

Prendre la cuvette, l'essuyer, la mettre dans la chambre d'électroporation, appuyer sur Pulse jusqu'au signal sonore

Lire la **constante de temps** qui doit être comprise **entre 4.8 et 5.2**

Si arc électrique, rajouter immédiatement 10 μ l d'ED dans la cuvette et recommencer

Retirer la cuvette de la chambre, mettre immédiatement le 1 ml de SOC, homogénéiser à la pipette, transférer dans le tube Eppendorf préparé.

Etaler, à l'aide de billes de verre stériles, sur 2YT agar, 10 μ l et 50 μ l (en les complétant à 100 μ l avec du SOC) et (éventuellement) 100 μ l de suspension

➤ Quand on travaille en [chloramphenicol](#), transférer la suspension dans un tube fond rond de 10 ml et mettre [sous agitation à 37°C une heure](#) avant d'étaler sur gélose.

Incuber les boîtes O/N à l'étuve à 37°C

Les «transfo» sont stockés à 4°C

Le lendemain matin, regarder les boîtes de culture ; les colonies doivent être assez grosses pour discerner les blanches des bleutées ; les sortir et les mettre à 4°C jusqu'au lendemain pour laisser évoluer la coloration bleue.

Compter les colonies blanches et bleues et calculer le pourcentage de clones blancs par rapport au nombre total de clones.

Le pourcentage de colonies blanches doit être supérieur à 25%

Repiquage et sauvegarde des clones

Préparer une plaque (fond rond) avec 150 µl par puits de bouillon 2YT additionné de l'antibiotique adéquat et de 10% de glycérol.

Préparer une macro-plaque 96 puits avec 1 ml par puits de bouillon 2YT additionné de l'antibiotique adéquat.

Les clones blancs (attention aux clones bleutés !) sont repiqués en parallèle sur la plaque « glycérol » et sur la macro-plaque.

Mettre la plaque « glycérol » à l'étuve à 37°C O/N. Après culture, l'envelopper dans du papier Saran et la stocker à -80°C.

Mettre la macro-plaque à incuber à 37°C sous agitation (600 t/min) O/N (**thermomixer Eppendorf**)

Extraction des plasmides recombinants

Plusieurs kits sont commercialisés permettant l'extraction du couple vecteur / insert.

Ils sont tous basés sur le même principe.

Pour le mode opératoire, se référer à la technique décrite par le fournisseur.

[Plasmid MiniPrep Kit](#) de chez Millipore

[Perfectprep Plasmid 96 Vac, Direct Bind](#) de chez Eppendorf

(c'est celui utilisé actuellement)

Dépôt sur gel d'agarose 0.7% en TBE 0.5X

Marqueur Supercoiled DNA Ladder (car ADN non coupé)

2 µl d'ADN + 6 µl de TE/bleu : déposer la totalité

Migration à 100 V, 30 min (et plus si nécessaire)

→ Vérifier la taille du plasmide recombinant extrait ; elle doit être égale à celle du vecteur + celle de l'insert ; en déduire la taille de l'insert qui doit correspondre à celle visualisée sur le gel de

contrôle après β agarase. Le nombre de vecteurs vides et de plasmides « contaminants » de taille sous estimée ne doit pas être supérieur à 5% pour que la banque soit valide.

Si besoin est, faire une **digestion à la BstXI** pour linéariser l'ADN et vérifier les tailles :

ADN	0.5 μ l
Tampon 10X	2 μ l
BstXI	1 μ l
ED	16.5 μ l

Incuber 1h30 à 55°C

(Vérifier toujours la concentration du tampon et la température de travail de l'enzyme qui peuvent varier suivant le fournisseur)

Dépôt sur gel d'agarose 0.7% en TBE 0.5X

Marqueur Raoul 8 μ l

Déposer la totalité de la digestion : 20 μ l (+ 2 μ l de bleu)

Migration à 100 V, 30 min (et plus si nécessaire)

Réaction de séquence

- Régénération des primeurs

Le primeur est re-suspendu à une **concentration stock de 100 μ M** (= 100 pmol/ μ l)

C'est-à-dire qu'à une primeur livrée à 72 nmol, on ajoute 720 μ l d'ED.

Pour les PCR,

Cette solution sera diluée au 1/10 (concentration finale = 10 μ M = 10 pmol/ μ l)

Pour les séquences,

Elle sera diluée au 1/20 (concentration finale = 5 μ M = 5 pmol/ μ l)

- Réaction de séquence

En plaque 96 puits, mettre par puits :

DNA	2 μ l
Big dye	3 μ l
Primeur à 5 pmol	0.5 μ l (LM/SM pour pCDNA)
ED	4.5 μ l

Plus simplement, préparer un mélange réactionnel avec :
360 μ l de Big Dye

60 µl de primeur
540 µl d'ED
En mettre 8 µl par puits
Ajouter ensuite les 2 µl de DNA

Mettre la plaque dans la machine à PCR, programme « catdye 25 » c'est à dire :

96°C / 5 min
94°C / 30 s
50°C / 20 s
60°C / 4 min
25 cycles
Hold 15°C

- Purification des séquences par filtration sur Séphadex

Préparation du Séphadex

Faire une solution à 5% dans l'eau ; laisser au repos à t° du labo pendant 3 h minimum ; retirer ensuite une grande partie de la couche aqueuse en laissant environ un cm d'eau au-dessus de la surface du Séphadex. Stocker ensuite à 4°C.

Préparation de la plaque de filtration

Faire le « montage » suivant :

Sur un socle marron, mettre une plaque « MicroAmp » (AB Applied Biosystems) dite de « récupération » et au-dessus une plaque « Multiscreen MAHVN45 » (Millipore) propre dont le fond des puits est constitué de silice.

Mettre dans chaque puits 400µl de Séphadex (le re-suspendre régulièrement en cours de pipetage)
Centrifuger 2 min à 500 **g**

Sur la centrifugeuse Sigma 3K15

Régler le curseur en RCF à 500

Jeter le contenu de la plaque « récup », reconstituer le montage

Remettre 200 µl de Séphadex

Re-centrifuger 2 min à 1200 **g**

Sur la centrifugeuse Sigma 3K15

Régler le curseur en RCF à 1200

Remplacer la plaque « récup » par une plaque identique neuve et identifiée dans laquelle sera récupéré l'ADN

Si la réaction de séquence a été faite dans 10 μ l, ajouter 10 μ l d'ED stérile par puits et transférer le tout sur les carottes de Séphadex.

Attention à l'orientation des plaques !

Centrifuger 2 min à 1200 **g**

Sur la centrifugeuse Sigma 3K15

Régler le curseur en RCF à 1200

La plaque est prête à être séquencée...

Extraction des inserts

C / Technique à la β agarase modifiée

(précipitation isopropanol)

Préparation du tampon MEN

Composition :

MES	20 mM	EDTA	5 mM
NaCl	150 mM		

Solutions mères : MES 1M → 1 ml (vérifier qu'elle n'ait pas précipité)
 EDTA 0.5M → 0.5 ml
 NaCl 4M → 1.875 ml
 qsp 50 ml d'ED

Le filtrer.

Mode opératoire

Rincer les blocs 3 fois 10 min en tampon MEN, sur la roue.

Les faire fondre à 68°C 5 min (10 min maxi)

Laisser tempérer 2-3 min à 42°C. Mesurer (à la pipette) le volume de fonte

Ajouter la **β agarase** : 2 μ l pour 100 μ l d'échantillon
Incuber à 42°C, 2 h minimum et jusqu'à O/N
(Si on laisse plus de 2 h, rajouter 1 μ l de β agarase par 100 μ l de suspension)
Centrifuger 5 min à 10000 t/min (centri tempérée à 20°C)
Prélever le surnageant

S'il reste un culot d'agarose, recommencer idem sur ce culot
Si OK, on précipite à l'isopropanol comme suit :

Vol de l'échantillon
+ 0.5 μ l de glycogène
+ 0.2 vol d'acétate d'ammonium 10M
+ 0.7 vol d'isopropanol (t° ambiante)
Laisser 15 min dans la glace
Centrifuger 15000g 15 min

Récupérer le surnageant
+ 2 vol d'isopropanol (t° ambiante)
Vortexer, mettre 15 min dans la glace
Centrifuger 15000g 15 min

Éliminer le surnageant
Laver le culot à l'isopropanol à 70% froid (-20°C)
Sécher à t° ambiante
Reprendre le culot sec avec 10 μ l d'ED

Extraction des inserts

D / Technique à la β agarase **re-modifiée**

(sans extraction phénol chlo al iso)

Préparation du tampon MEN

Composition : **MES** 20 mM
 EDTA 5 mM
 NaCl 150 mM

Solutions mères : MES 1M → 1 ml (vérifier qu'elle n'ait pas précipité)
 EDTA 0.5M → 0.5 ml
 NaCl 4M → 1.875 ml
 qsp 50 ml d'ED

Le filtrer.

Mode opératoire

Rincer les blocs 3 fois 10 min en tampon MEN, sur la roue.

Les faire fondre à 68°C 5 min (10 min maxi)

Laisser tempérer 2-3 min à 42°C. Mesurer (à la pipette) le volume de fonte

Ajouter la β agarase : 2 μ l pour 100 μ l d'échantillon

Incuber à 42°C, 40 min-1h

Centrifuger 5 min à 10000 t/min (centrifugée à 20°C)

Prélever le surnageant

S'il reste un culot d'agarose, recommencé idem sur ce culot

Si OK : estimation de la quantité d'insert sur gel d'agarose 0.7% en TBE 0.5X

Marqueur Raoul 8 μ l

5-7 μ l d'ADN + 3-5 μ l de TE/bleu : déposer la totalité (vol d'ADN déposé en fonction du vol récupéré après β agarase)

Migration à 100 V, 1^{ère} lecture à 5 min, puis + 15 min...

ANNEXE VI

Microséquençage oligonucléotidique Sequencing by Oligonucléotide Ligation and Detection : Système SOLID

Deux étapes sont à considérer dans ce nouveau système de Micro séquençage oligonucléotidique :
L'étape de Préparation et l'étape Test proprement dite

L'émulsion – basé sur le système par amplification clonale emPCR de l'échantillon constitué de banque d'ADN implique 7 étapes majeures : la méthode présentée dans ce manuel consiste à traiter l'un ou plusieurs échantillons avec le système SOLID

Des variantes de cette procédure en place pour accueillir différents types de banque d'ADN et le nombre de différent des besoins en billes pour l'expérience.

Elle comporte Sept étapes au total dont les 4 premières constituent la phase de préparation et les trois dernières la phase test proprement dite

- 1- Préparation des réactifs : huile d'émulsion, Mix pour l'amplification
- 2 - Capture de la banque d'ADN par les billes
- 3 - Emulsion
- 4 - Amplification par émulsion
- 5 - Identification des billes : émulsion et premiers lavages : lavages et récupération des billes
- 6 - Enrichissement de la banque d'ADN des billes enrichies
- 7 - Collection des billes enrichies en ADN – amplification des séquences d'ADN

RESUME SUR LA TECHNOLOGIE SOLID - ABI (Seq. by Oligo Ligation/Detection)

 Tech Summary: ABI's SOLiD (Seq. by Oligo Ligation/Detection)



Appareil pour Microséquençage par le système SOLID (Seq. by Oligo Ligation/Detection),

Applied Biosystems vient de lancer son instrument, qui appuie leur version de la chimie de séquençage à haut débit, appelé "™ SOLiD» (petit "i", s'il vous plaît). Acquis auprès d'Agencourt Personal Genomics à la fin de 2008, SOLiD est une composition chimique unique parallèle qui permet de réaliser le séquençage simultané de milliers de molécules individuelles d'ADN.

Ici, je vais présenter un bref aperçu de la technologie, destiné à ceux qui n'ont pas eu le temps de devenir très familier avec la chimie. Les chiffres et les informations prises directement à partir de cette présentation proviennent du système ABI (Applied Bio system).

Le séquençage sur la machine solide commence avec la préparation de la banque d'ADN. Dans cette banque, on dispose de fragment simple brin, de deux adaptateurs différents qui sont ligaturés à l'ADN génomique cisailé (panneau de gauche de la Fig. 1). Si une analyse plus rigoureuse structurale est souhaitée, une banque «pote-paire" peut être générée de manière similaire, en incorporant une étape de circularisation / clivage avant la ligature par l'adaptateur (panneau de droite de la figure 1).

Les différentes étapes sont ainsi résumées

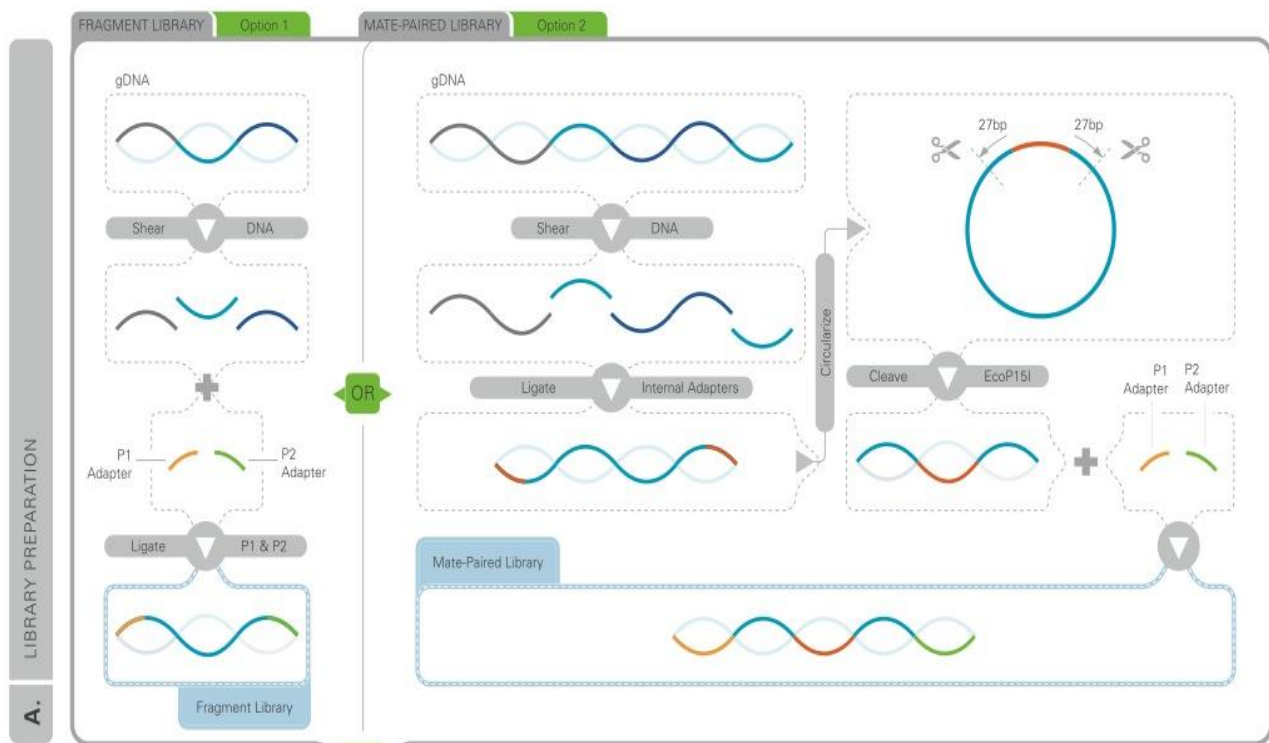


Figure 1. Génération bancaire schématique

Une fois que les adaptateurs sont ligaturés à la banque de gènes, l'émulsion par PCR est effectuée en utilisant des amorces communes pour générer des clones "billes" qui contiennent chacune une seule espèce d'acide nucléique.

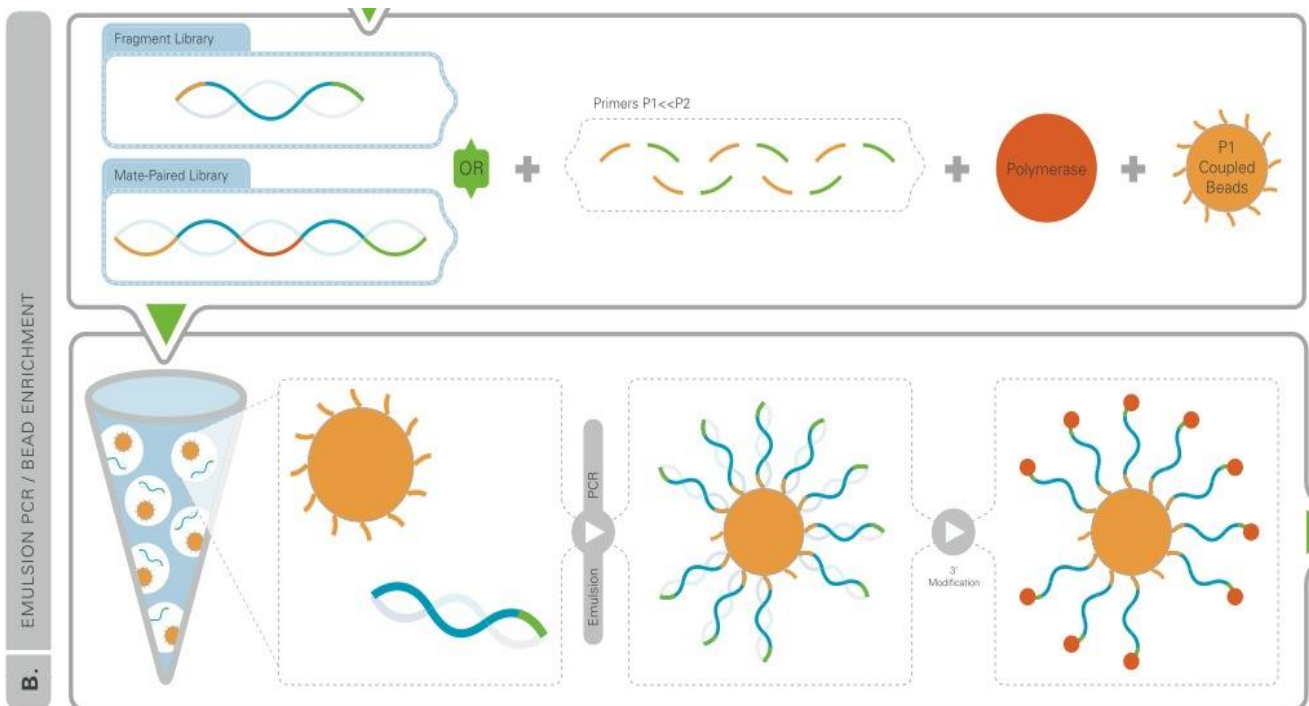


Figure 2. Echantillon de Banque de génération clonale par l'intermédiaire d'émulsion PCR ...

Chaque bille est ensuite fixée à la surface d'une cellule d'écoulement via des modifications 3' à des brins d'ADN.

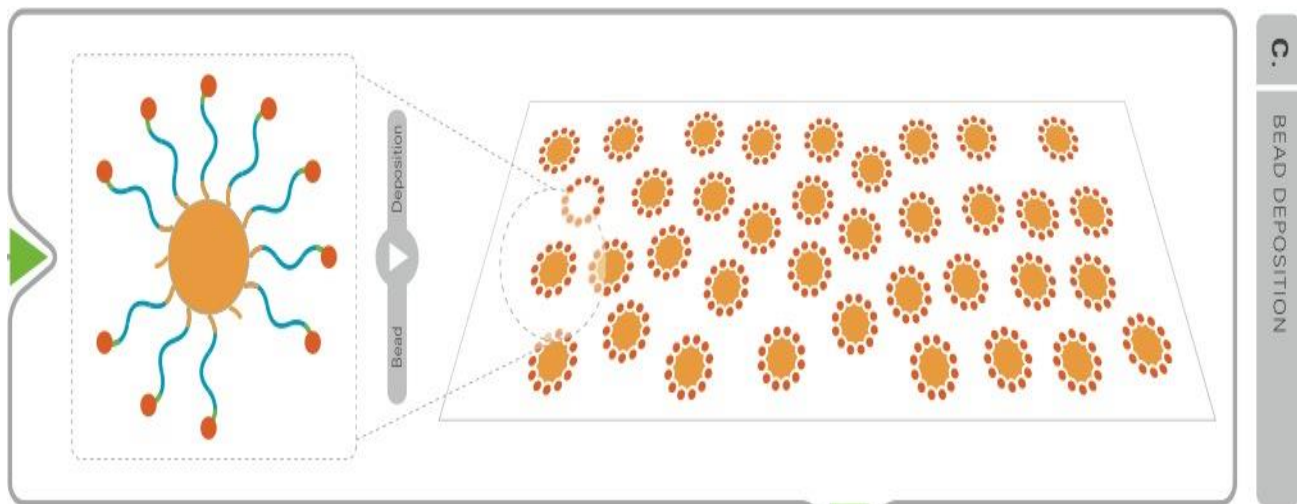


Figure 3. Dépôt des billes dans la cellule de flux via des modifications de fin

À ce stade, nous avons une cellule d'écoulement (essentiellement une lame de microscope qui peut être en série exposée à des liquides souhaités) dont la surface est recouverte de milliers de billes contenant chacun une seule espèce d'ADN génomique, avec des adaptateurs uniques à chaque extrémité. Chaque microbille peut être considérée comme une réaction de séquençage séparée qui est contrôlée simultanément par l'intermédiaire d'imagerie numérique séquentiel. Jusqu'à ce point toutes les technologies next-gen de séquençage sont très semblables, c'est là que l'ABI / diverge considérablement SOLiD (voir figure 4).

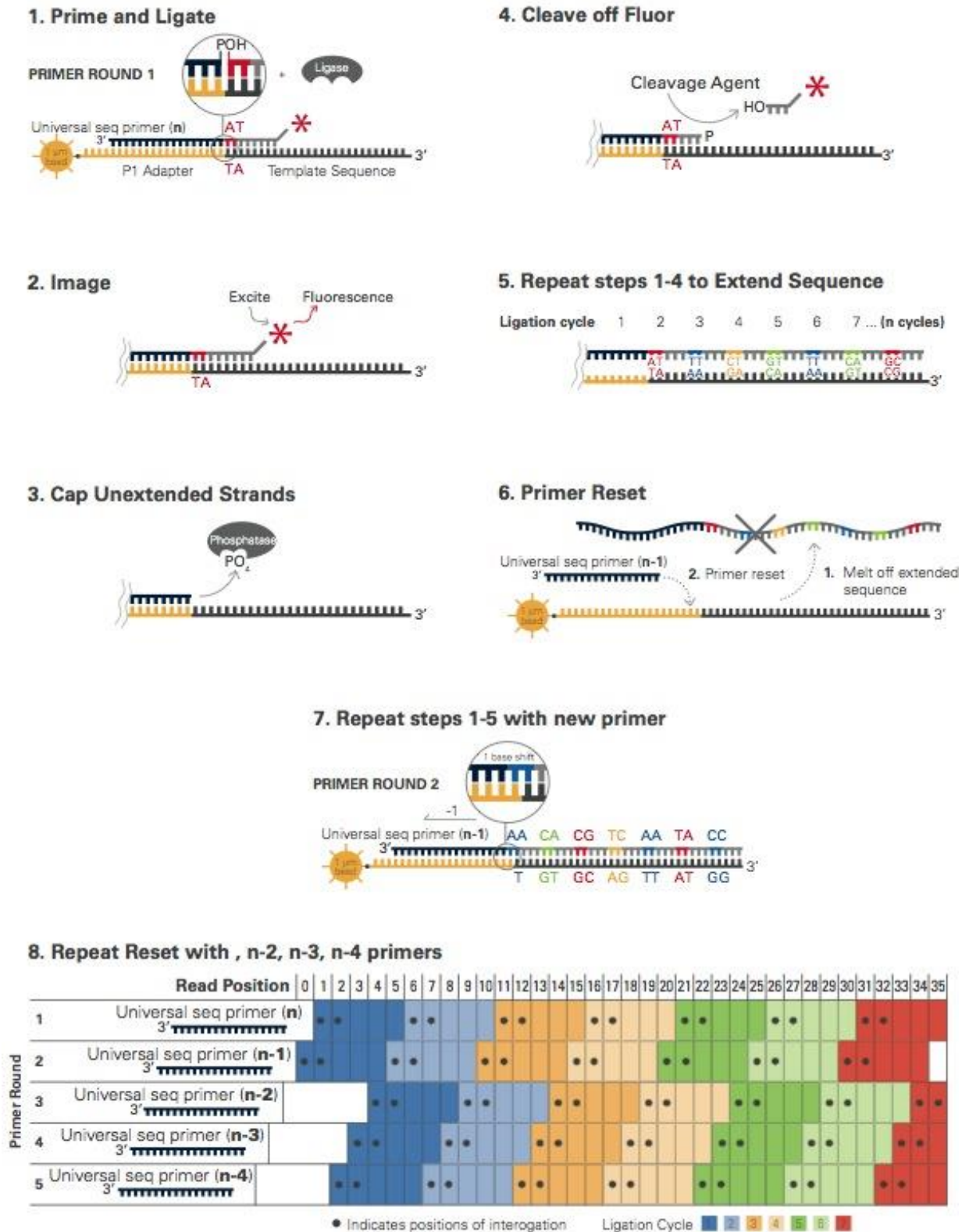


Figure 4. Schéma du séquençage par le système ABI chimie du solide v2.0. qui utilise moitié codage (signifiant des bases équivalent au 1/2 de la sonde et qui sont des bases spécifiques liées aux appels colorimétriques). La version originale de la chimie utilisée correspond à 4,5 sondes codées

La détection de la base réelle ne se fait plus par l'incorporation polymérase axée sur des terminaisons marquées

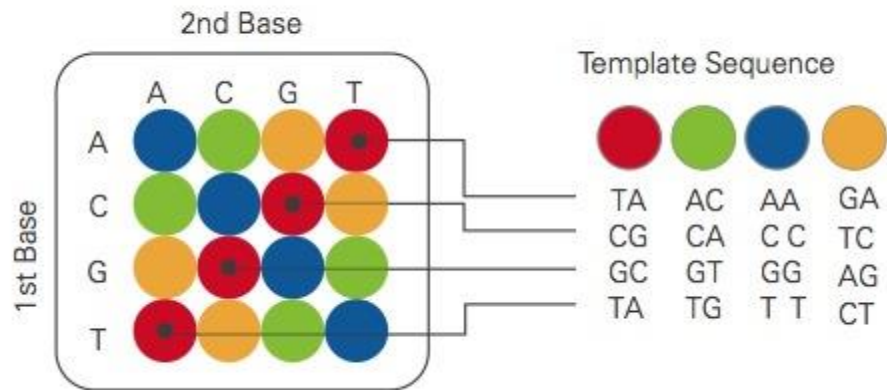
didésoxygénine. A la place, le système SOLiD utilise un mélange d'oligonucléotides marqués et interroge le brin d'entrée avec la ligase. Maîtriser l'idée que le mélange oligo marqué est la clé pour comprendre cette technologie solide.

Chaque oligo a des positions dégénérées sur les extrémités 3' et 5' des bases nucléotidiques, et l'un des 16 dinucléotides spécifiques à des positions 1-2 (numérotée à partir l'extrémité 3'). Positions 6 à l'extrémité 5 'sont aussi dégénérer (inosine probable, non confirmé), et maintenez l'un des quatre colorants fluorescents. Le séquençage consiste à mener les étapes suivantes:

1. Réaliser l'hybridation d'une amorce, et ligaturer un mélange d'oligos fluorescents (8-Mers), dont la 1re et 2e 3 «bases soient correspondantes à celle du modèle étudié
 2. Plafonnement des fragments inétendus avec le même mélange de sondes non fluorescentes
 3. Traitement à la phosphatase pour empêcher les brins restants inétendus de contribuer à sortir des événements de ligature en phase
 4. Détection par le fluor spécifique.
 5. Enlèvement de fluor par deux clivage chimique de l'étape 5 trois «bases. Ce qui laisse derrière une sonde de base 5 ligaturée, avec un phosphate en 5 '
 6. Répétez cette fois l'interrogation des bases dans les 6e et 7e étapes
 7. Après des cycles de 5 à 7, effectuer une «reset», dans lequel les amorces initiales et toutes les portions ligaturés sont fondus à partir du modèle et mis au rebut.
 - 8 Par la suite, une nouvelle amorce initiale est utilisée qui est le N-1 de longueur. Il y'a ensuite une répétition du cycle initial (étapes 1-5) qui va générer désormais un ensemble de données qui se chevauchent (bases 1/2, 6/7, etc, voir la figure 4, l'étape 8 ci-dessus).
- Réaliser ainsi des réactions suivies par ligation 5-7 avec 5 cycles de remise à zéro d'amorces qui sont répétées pour générer des données de séquence d'environ ~ 35 bases contiguës, dans lequel chaque base a été interrogée par deux oligonucléotides différents.

Si vous faites le calcul vous avez réalisé qu' il y'a au total 16 dinucléotides possibles (4^2) et seulement 4 colorants. Donc, les données d'une seule couleur ne vous indiqueraient pas que la base est à une position donnée. C'est là que l'éclat (et la confusion potentielle) vient à propos de ce nouveau système SOLiD. Il y'a 4 oligos pour chaque colorant, ce qui signifie qu'il ya quatre dinucléotides qui sont codées par chaque colorant.

Possible Dinucleotides Encoded By Each Color



Double Interrogation

With 2 base encoding each
base is defined twice

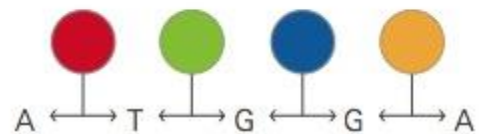


Figure 5. Schéma d'encodage dibase, et comment il se rapporte à l'appel de la séquence matrice réelle

Par exemple (voir Fig.5), les dinucléotides CA, CA, TG, et GT sont tous encodés par le colorant vert. Parce que chaque base est interrogé deux fois, il est possible, en utilisant les deux couleurs, de déterminer quelles positions de bases étaient impliquées au cours de l'expérience. Ce système de requête à deux couleurs (connu sous le nom "espace de couleur" dans le système ABI-) a quelques conséquences intéressantes en ce qui concerne l'identification des erreurs. Une explication détaillée de l'espace couleur et ses problèmes particuliers peuvent être trouvées dans la littérature. L'un des effets secondaires de ce double codage, c'est que lors de l'alignement à une référence et de tenter de déterminer les variantes ... variantes vraies suivra spécifiques de changement de couleur des «règles» telles que définies ci-dessous dans la figure 6.

Single SNP Sites

If 2 colors present: e.g.



- Reverse the colors



- Use other 2 colors, both combinations



If 1 color present: e.g.



- Can be the other 3 color pairs:



Figure 6. Règles colorimétrique variantes valides

Détection d'un vrai SNP (Single Nucleotide Polymorphism) se traduit par des changements dans deux appels colorimétriques adjacents, ce qui doit suivre les règles ci-dessus. Figure 7 ci-dessous donne quelques exemples de ce principe dans l'examen des alignements.

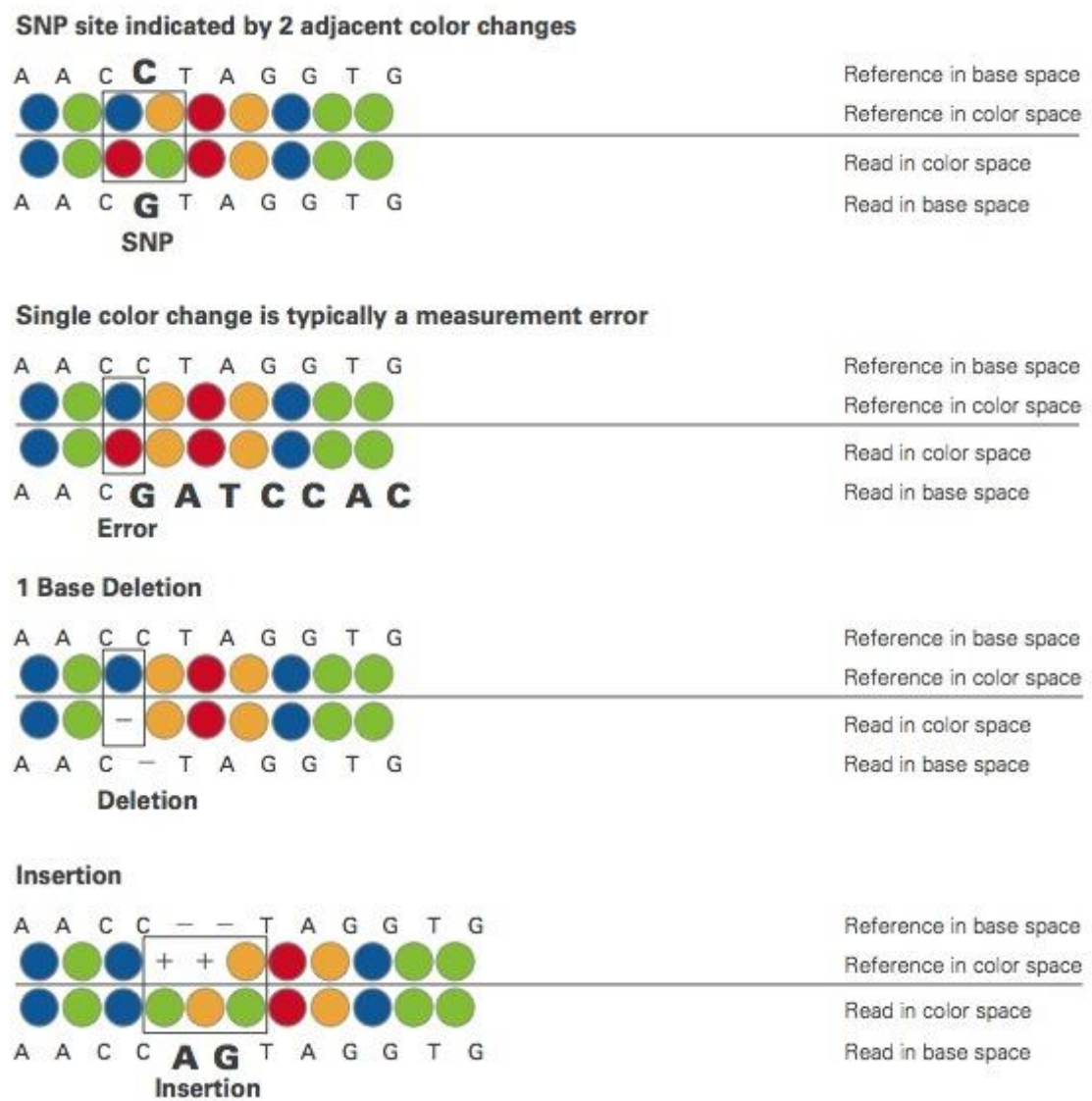


Figure 7. exemple colorimétrique

RESUME

La maladie charbonneuse ou Anthrax ou Charbon bactérien est due à une bactérie de la famille des *Bacillaceae*, *Bacillus anthracis* (dénommée Bactérie charbonneuse par Davaine en 1863) qui a fait l'objet d'une attention particulière au Sénégal, par les importantes pertes économiques occasionnées dans le cheptel ruminant dans certaines zones écologiques plus précisément dans la zone des Niayes.

L'objectif principal de cette thèse est axé sur la caractérisation des séquences génomiques de *Bacillus anthracis* pour des souches sénégalaises et gambiennes par comparaison à d'autres souches de référence et sur l'étude du pangénome de *Bacillus anthracis*, de ces souches, une première du genre après celle trouvée par Tettlin *et al.*, en 2005 à partir du génome de *Streptococcus agalactiae*. Des études microbiologiques classiques ont permis l'isolement et l'identification de ces souches de *Bacillus anthracis*, de même que leur purification et leur conservation à -80°C. Des études moléculaires de ces souches purifiées ont permis de caractériser les séquences génomiques d'espèces originaires du Sénégal et de la Gambie. L'analyse des séquences nucléotidiques par bio informatique de ces génomes a montré une identité de séquence pour la souche *Bacillus anthracis* dans les deux pays ciblés.

Cette séquence de *Bacillus anthracis* a été comparée aux souches de référence et est identique à celle obtenue à partir du génome de la souche Sterne (Institut Pasteur de Paris) de la souche CDC 684 (NCBI – USA) et de celle de la H9401 trouvée chez un humain atteint d'Anthrax en Corée.

Grâce à la méthode MAUVE, les auteurs ont estimé le pangénome de *Bacillus anthracis* comme disposant de 2893 gènes, de 7 gènes uniques et de 85 gènes accessoires et ont pu confirmer sa nature fermée, avec le core génome qui représente 99 p 100 de sa taille totale. Il est envisagé ainsi à partir de ces souches dont les séquences sont connues, la mise au point d'un vaccin recombinant contre la maladie du charbon des ruminants.

MOTS CLES : Anthrax, *Bacillus anthracis*, Génome, pangénome, Gambie, Sénégal, *Streptococcus agalactiae*

SUMMARY

The disease anthrax is caused by bacteria of the family of *Bacillaceae* *Bacillus anthracis* (called Bacteridie by Davaine in 1863), and were a subject for special attention in Senegal by the significant economic losses observed on the stock of cattle in some ecological zones more precisely in the Niayes's area.

Conventional microbiological studies allowed the isolation and identification of *Bacillus anthracis* strains and their purification and storage at -80°C. Studies of these purified strains have allowed characterizing and identifying the genomic sequences of these species originated from Senegal and Gambia. The analysis of oligonucleotide sequences by bio informatic indicates a sequence identity for *Bacillus anthracis* in both countries areas.

These *Bacillus anthracis* sequences were compared and were identical to that found in Korea from human suffering of anthrax.

This study has allowed the possibility to characterize *Bacillus anthracis* pangénome, the one after that found by Tettlin and coll in 2005 from *Streptococcus agalactiae* genome.

The authors have estimated with Mauve method the Senegalese and Gambian *B.anthraxis* pan-genome which includes 2893 core genes, 7 single genes and 85 accessory genes. Theses authors have also notified the closed nature of *B.anthraxis* pan - genome for theses strains, where the core genome represents 99% of the total size and validated the hypothesis that Senegalese and Gambian *B.anthraxis* strains have a closed pan-genome. It will be an opportunity to make a recombinant vaccine against Anthrax to protect animal and human from this zoonotic disease.

KEYWORDS : Anthrax, *Bacillus anthracis*, Genomic, pan -genome, Gambia, Senegal, *Streptococcus agalactiae*,