

Apport de la biologie moléculaire pour la connaissance de la fièvre charbonneuse en France

Guillaume Girault (1), Sylviane Derzelle (1) (sylviane.derzelle@anses.fr)

(1) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, Unité Zoonoses bactériennes, Maisons-Alfort, France

Résumé

Zoonose sporadique en France, la fièvre charbonneuse (FC) n'en reste pas moins présente sur le territoire français. Au cours de la dernière décennie (2001-2013), soixante-neuf foyers animaux de FC ont été recensés. Le nombre de foyers déclarés chaque année est extrêmement variable, allant d'années exemptes (2012) à des années propices à la résurgence de cas de FC (19 foyers en 2008 ou 22 foyers en 2009). Aujourd'hui, le diagnostic des cas de FC se limite à la détection et à la confirmation de l'espèce de l'agent causal, *Bacillus anthracis*. *B. anthracis* est une espèce bactérienne très monomorphe, présentant peu de variabilité d'un point de vue génétique. Seules certaines techniques de biologie moléculaire à haut pouvoir résolutif permettent une discrimination des souches entre elles. Afin de mieux connaître la diversité des souches de *B. anthracis* présentes en France et les relations phylogénétiques qu'entretiennent ces souches entre elles, une analyse génomique ambitieuse a été menée au sein du laboratoire national de référence, à l'Anses. Le séquençage à haut débit de 125 génomes de *B. anthracis* collectés en France depuis soixante ans a été réalisé. Cette étude a permis l'obtention d'une cartographie extrêmement précise des génotypes de *B. anthracis* présents sur le territoire. Au cours de ce travail, l'identification d'un grand nombre de marqueurs diagnostiques de type SNP (polymorphisme de séquence unique) permettra à l'avenir une caractérisation fine de cet agent pathogène important, ainsi qu'une surveillance adéquate de cette zoonose grave lors des foyers de FC.

Mots-clés

Bacillus anthracis, France, polymorphismes de séquence uniques (SNP), génotypage

Abstract

Contribution of molecular biology to knowledge of anthrax in France

*Although anthrax is a sporadic zoonosis in France, it nevertheless is still found in the country. Over the last twelve years (2001-2013), 69 anthrax outbreaks have been reported in animals. The number of outbreaks declared each year is extremely variable, certain years being entirely free of cases (2012, for example) and others showing a resurgence of the disease (19 outbreaks in 2008 and 22 outbreaks in 2009, for example). Today, diagnosis of anthrax is limited to the detection and confirmation of the causative agent of the disease, *Bacillus anthracis*, which is a monomorphic bacterial species with very low genetic variability. Only a few high-resolution typing methods are able to discriminate between strains. To increase knowledge of the diversity of *B. anthracis* strains in France and of the phylogenetic relationships that they share, an ambitious genomic analysis campaign has been conducted at the ANSES National Reference Laboratory for anthrax. This included the high-throughput DNA sequencing of 125 *B. anthracis* genomes isolated in France over a 60-year period. This study provided an extremely precise picture of the distribution of the *B. anthracis* genotypes found in France. Within this framework, the identification of a diagnostic marker pattern (Single Nucleotide Polymorphisms) will provide accurate characterization of this important pathogen, including appropriate surveillance during anthrax outbreaks.*

Keywords

Bacillus anthracis, France, Single Nucleotide Polymorphisms, Genotyping

La fièvre charbonneuse (FC) (ou charbon bactérien) est une zoonose grave de répartition mondiale causée par une bactérie sporulée « tellurique », *Bacillus anthracis* (OIE, 2008) (Encadré 1). Outre sa capacité de sporulation, *B. anthracis* possède plusieurs facteurs de virulence codés par des gènes situés sur ses deux plasmides (pXO1 et pXO2): une capsule aux propriétés anti-phagocytaires et deux exotoxines de type A-B, le facteur Oedématogène (EF) et le Facteur Létal (LF), partageant un même facteur assurant la translocation à travers les membranes cellulaires vers le cytosol des deux autres facteurs, le facteur PA (Protective Antigen) (OIE, 2008).

L'infection d'un hôte peut avoir lieu par inhalation, ingestion ou contamination cutanée par le biais d'une plaie ou d'une piqûre d'insecte. La forme respiratoire est la plus fulgurante. Après pénétration des spores dans le système respiratoire de l'hôte, elles germent en présence de CO₂. Les bacilles vont ensuite synthétiser leur capsule, se multiplier rapidement et libérer leurs toxines. Bactéries et toxines finissent par se disséminer dans la circulation sanguine et provoquent la mort par septicémie et choc exotoxinique. Les animaux les plus exposés sont les herbivores (bovins, ovins, caprins, équins), et plus particulièrement les ruminants qui contractent généralement la maladie en ingérant des spores au cours de leur pâture (ingestion d'herbe ou de terre contaminée). En France, les cas humains sont excessivement rares. Pour les éleveurs et les personnes en contact avec les animaux, le principal risque réside dans la contraction d'un charbon cutané suite à la manipulation sans précaution d'animaux malades ou morts.

Encadré 1. Fièvre charbonneuse

Classée dans la liste de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), la fièvre charbonneuse fait partie en France des dangers sanitaires de catégorie 1 en médecine vétérinaire (articles L. 223-2 et suivants, et D. 223-2 du Code rural) qui donnent lieu à l'application de mesures de police sanitaire. C'est également une maladie à déclaration obligatoire en médecine humaine depuis 2001. Elle est reconnue comme maladie professionnelle (éleveurs, vétérinaires, microbiologistes...). Il s'agit d'une maladie potentiellement mortelle qui touche tous les mammifères, y compris l'Homme. Les herbivores (bovins, ovins, caprins, équins) sont les plus sensibles. Ils contractent généralement la maladie en ingérant des spores au cours de leur pâture (ingestion d'herbe ou de terre contaminées) et développent le plus souvent des formes suraiguës ou aiguës de la maladie. Chez l'Homme, le contact d'animaux infectés, l'ingestion d'aliments contaminés ou la respiration de poussières contenant des spores peuvent être responsables de la maladie. Les formes cutanées, suites à des piqûres, des coupures ou des éraflures, sont majoritaires (95 % des cas) et le plus souvent bénignes.

Encadré 2. Définition des cas et des foyers animaux

Un cas confirmé de FC correspond à un animal dont un prélèvement a permis l'isolement de *B. anthracis*. Un cas présumé de FC correspond à un animal dont la mort a été imputée à la FC, sans confirmation par une analyse biologique. Enfin, un foyer correspond à un lot d'animaux dans lequel au moins un cas de FC a été observé.

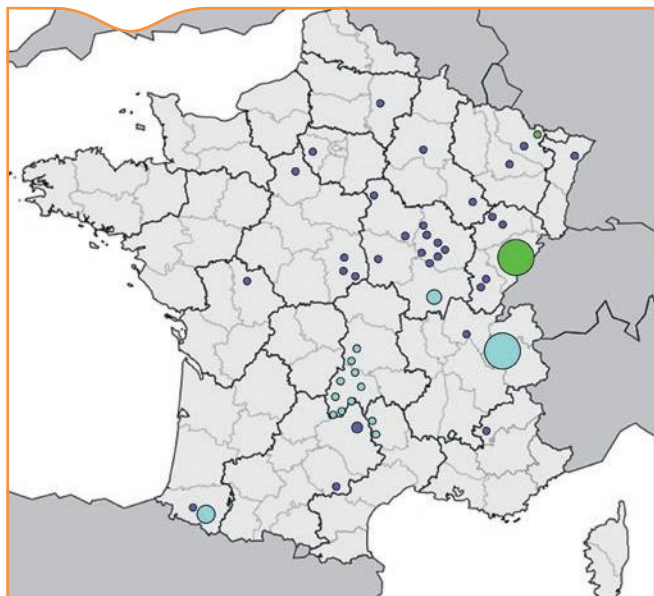


Figure 1. Répartition des foyers de FC en France et des sous-lignées associées (1953-2013)

La figure représente la répartition géographique des foyers de FC observés en France depuis soixante ans. Les trois sous-lignées présentes à l'état naturel sont représentées selon le code couleur suivant : la sous-lignée Transeurasienne A.Br.011/009 en violet, la sous-lignée majoritaire B.Br.Cneva en bleu ciel et enfin, la sous-lignée minoritaire A.Br.001/002 en vert. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de souches qu'ils représentent.

Aujourd'hui, en France, cette zoonose est observée de manière assez sporadique chez les animaux. Au cours de la dernière décennie (2001-2013), soixante-neuf foyers animaux de FC ont été recensés (Encadré 2). Leur nombre est extrêmement variable d'une année sur l'autre, avec des années sans foyer confirmé (comme 2010 et 2012) et des années plus marquées (2008 et 2009). Les épisodes de FC sont généralement de faible importance avec un ou deux foyers et un ou deux animaux morts par foyer. Cependant, il n'est pas exceptionnel que des épisodes plus conséquents se produisent. Ainsi, en 2009, un taux record de vingt-deux foyers répartis dans cinq départements a été observé. En tout, cinquante-trois bovins, quinze caprins et deux chevaux sont morts (Fediaevsky *et al.*, 2009). En 2008, un épisode de dix-sept foyers se déclarant concomitamment sur plusieurs communes proches a été rapporté dans le Doubs. Au total, trente-neuf bovins sont morts et quatre-vingt-onze autres ont été traités par antibiotiques. Une vaste opération de vaccination de près de 12 000 bovins a été entreprise sur quinze communes (Calavas *et al.*, 2008). La répartition des cas de FC concerne quasiment tout le territoire français, à l'exception de certaines régions, comme la Bretagne (Figure 1). La grande majorité des foyers s'observe cependant dans les départements français ayant un lourd passé charbonneux, essentiellement dans le Massif Central, les Alpes, la Bourgogne et la Franche-Comté (Madani *et al.*, 2009; Vaissaire *et al.*, 2001). En effet, les spores de *B. anthracis* peuvent persister dans le sol pendant de longues périodes (demi-vie pouvant aller jusqu'à 100 ans), assurant de ce fait la pérennité de l'espèce.

Bacillus anthracis, un pathogène clonal

L'agent causal de la FC est considéré comme une espèce bactérienne relativement jeune sur le plan évolutif, ayant émergé de l'espèce *Bacillus cereus* suite à l'acquisition de deux plasmides de virulence (Keim and Wagner, 2009). D'un point de vue génétique, *B. anthracis* est l'une des bactéries les plus homogènes qui soient. C'est une espèce clonale dont il est difficile, voire impossible, de différencier les souches entre-elles au moyen de méthodes de typage classiques (biochimique, bactériologie/phénotypique, séquençage de l'ARNr 16S ou 23S). Cette homogénéité inter-souches exceptionnelle est le résultat d'un cycle de vie particulier.

B. anthracis passe la majorité de sa vie sous forme de spores dormantes dans le sol. Des décennies peuvent se passer entre deux cycles infectieux. Durant cette phase, l'organisme est peu exposé aux modifications et variations que subit en continu le matériel génétique (liées à la présence de phages, à la réplication de l'ADN). L'évolution du génome est ainsi statique ou du moins grandement réduite.

La biologie moléculaire au service du typage

Acquérir la capacité de distinguer suffisamment de différences entre deux souches est très important pour déterminer avec certitude qu'une souche particulière est à l'origine d'un foyer de FC ou d'un cas humain. Le défi majeur pour développer une méthode de typage de haute résolution pour une espèce bactérienne clonale comme *B. anthracis* réside en l'identification de caractères ou d'une combinaison de caractères uniques à chaque souche.

Depuis les années 2000, plusieurs méthodes existent pour différencier les souches de *B. anthracis* entre elles : certaines sont basées sur les séquences répétées présentes dans le génome (Multiple Locus Variable number of tandem repeats Analysis: MLVA) (Derzelle *et al.*, 2011; Keim *et al.*, 2000) et d'autres sur un petit nombre de mutations ponctuelles de type Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) réparties le long du génome (Girault *et al.*, 2014a; Van Ert *et al.*, 2007) (Encadré 3). Les polymorphismes nucléotidiques de type SNP sont des mutations extrêmement stables d'un point de vue évolutif, ce qui en fait des marqueurs de choix pour le génotypage. Un nombre limité de 13 à 14 SNP dits « canoniques » permet de déterminer précisément la position phylogénétique de tout isolat au sein des groupes et lignées majeures de *B. anthracis* retrouvées de par le monde (Marston *et al.*, 2011; Van Ert *et al.*, 2007). Il existe trois lignées majeures (A, B et C) et douze sous-groupes phylogénétiques au sein de l'espèce *B. anthracis*. La branche A présente une dispersion globale assez étendue et est la plus diversifiée. La majorité des isolats actuels se positionne dans cette lignée. La branche B ne représenterait qu'environ 15 % des cas mondiaux de FC récents. Sa distribution géographique se limite principalement à l'Afrique du Sud et à une partie de l'Europe dont la France. La lignée C est quant à elle plus anecdotique (seulement quelques isolats de laboratoire).

Ces approches (MLVA et analyse de canSNP (un set d'une dizaine de SNP phylogénétiquement informatifs) ont cependant un pouvoir résolutif quelque peu limité. Aucune n'a le pouvoir résolutif du séquençage complet de génomes. Avec l'accessibilité des nouvelles technologies de séquençage à haut débit (plateformes, diminution des coûts), les approches basées sur l'analyse de génomes complets prennent une part nouvelle et de plus en plus importante dans le génotypage des bactéries. Afin de mieux connaître la diversité existante en France au sein de l'espèce ainsi que la distribution naturelle des souches à travers le pays, le séquençage global de 125 souches « indigènes » de *B. anthracis* issues de la collection du Laboratoire national de référence pour la FC,

Encadré 3. Qu'est ce qu'un SNP ?

Le polymorphisme nucléotidique ou polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) est, en génétique, la variation d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce (exemple représenté ci-dessous, avec un SNP différenciant la souche Ames Ancestor de la souche Sterne). Ces variations sont très fréquentes chez tous les organismes vivants.

Les SNP sont générés par des erreurs de réplication de l'ADN non réparées par la suite, qui prennent place dans le génome à une très faible fréquence (10^{-10} changement par nucléotide et par génération pour *B. anthracis*). Les SNP sont des marqueurs diagnostiques importants, car ils sont stables d'un point de vue évolutif et présentent une probabilité faible de rétroversion.

Ames Ancestor
Sterne

GTTGTTG
GTTATTG

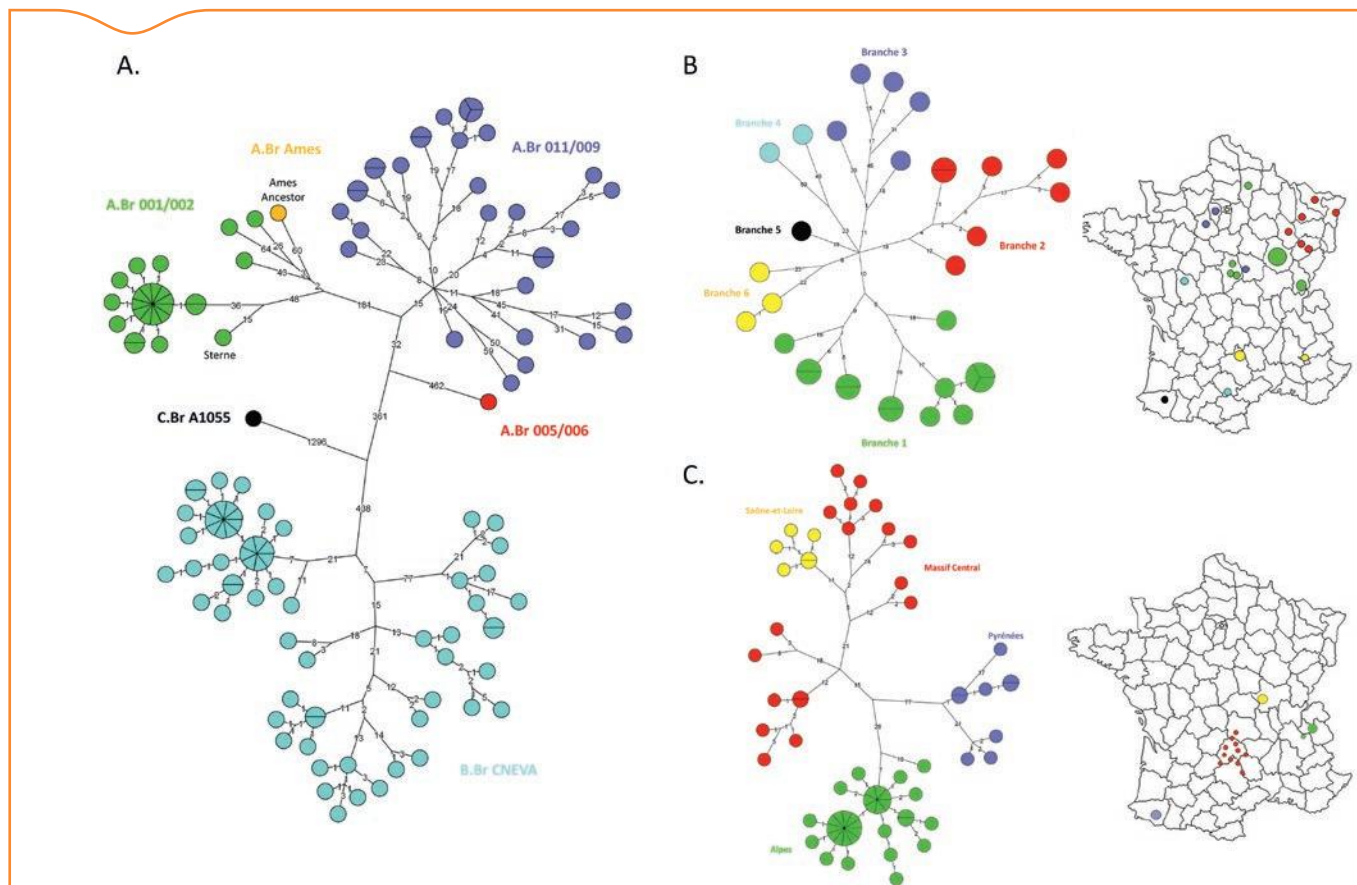


Figure 2. Cartographie à haute résolution de *B. anthracis* en France

- A. Le Minimum Spanning Tree (MST) représenté ici a été obtenu à partir de l'analyse des SNP sur génome complet des souches de la collection du LNR Charbon séquencées (125 souches) ainsi que de trois souches disponibles dans les bases de données génomiques (Ames Ancestor, Sterne et A1055). Une des souches de la collection LNR est une souche d'origine africaine (A.Br.005/006). Cet arbre phylogénétique a été obtenu à partir de 4018 SNP chromosomiques. Les sous-lignées sont représentées selon le code couleur suivant: A.Br.Ames en jaune, A.Br.001/002 en vert, A.Br.005/006 en rouge, A.Br.011/009 en violet, B.Br.Cneva en bleu ciel et C.Br.A1055 en noir.
- B. Représentation de la sous-lignée A.Br.011/009 en France. Le MST représente les six branches retrouvées en France. La carte de France représente leurs localisations géographiques.
- C. Représentation de la sous-lignée B.Br.Cneva en France. Le MST représente les trois grands groupes (Alpes, Pyrénées, Massif central) ainsi que le sous-groupe Saône-et-Loire. La carte de France représente leurs localisations géographiques.

à l'Anses, a été entrepris. La production de données génomiques a permis d'acquérir une somme considérable d'informations sur les souches de *B. anthracis* présentes dans les différentes régions de France. La connaissance exhaustive du polymorphisme existant au sein des séquences génomiques de ces souches a également permis de mettre en évidence des milliers de signatures ADN de type SNP uniques aux souches retrouvées en France. Près de 4000 SNP ont été identifiés, ce qui a permis l'obtention d'une cartographie à très haute résolution de la FC sur le territoire français (Figure 2A). La résolution obtenue est telle que l'on peut différencier presque toutes les souches sur la base de ce jeu de SNP spécifiques.

Distribution des génotypes de *B. anthracis* à l'échelle française

L'ensemble des isolats français se positionne au sein de trois des douze grandes sous-lignées phylogénétiques décrites dans le monde. Il s'agit des branches A.Br.001/002, A.Br.011/009 (lignée Transeurasienne) et B.Br.Cneva (Figure 1). La sous-lignée minoritaire A.Br.001/002 (16 % des souches) est exclusivement retrouvée dans le Nord-Est de la France. Elle est impliquée dans l'épisode de l'été 2008 du Doubs. La branche A.Br.011/009 (30 %) est à l'origine de nombreux cas sporadiques de FC dans différentes régions du territoire. La branche majoritaire B.Br.Cneva (54 %) compte près de la moitié des isolats de la collection de l'Anses. Les foyers qui lui sont attribués se localisent principalement dans la moitié Sud du pays, près des grands massifs montagneux (Alpes, Pyrénées, Massif Central). Elle est notamment impliquée dans l'épisode de l'été 2009 en Savoie.

Un regroupement géographique en trois ou quatre grands sous-groupes est obtenu pour la lignée B.Br.Cneva. Les souches isolées dans les Alpes sont toutes apparentées et se distinguent clairement des souches pyrénéennes ou de celles du Massif central. Un sous-ensemble incluant les souches isolées en Saône et Loire se détache au sein de l'ensemble Massif Central (Figure 2C). Un regroupement géographique moins apparent en six sous-branches phylogénétiques est également observé pour les souches appartenant de la lignée Transeurasienne A.Br.011/009 dispersées à travers le territoire (Figure 2B). Les branches 1 et 2 regroupent des souches isolées dans un quart Nord-Est de la France. La branche 3 comprend des souches vaccinales de type Pasteur II ou Carbosap et quelques isolats collectés dans des départements proches de Paris. Les rares souches des branches 4, 5 et 6 sont issues, respectivement, de l'Ouest ou du Sud de la France, des Pyrénées, et du quart Sud-Est.

Développement d'un outil de typage par PCR

Parmi le jeu de plus de quatre mille mutations ponctuelles identifiées par séquençage, douze SNP canoniques représentatifs des sous-groupes génétiques et géographiques majeurs mis en évidence ont été sélectionnés pour développer un outil de typage moléculaire par réaction de polymérase en chaîne (PCR) permettant la discrimination des isolats français.

Parmi les différentes méthodes existantes pour cribler des SNP, une technique post-PCR peu onéreuse, ne nécessitant pas l'achat de sondes

nucléotidiques marquées spécifiques à chacun des allèles de SNP à discriminer, a été choisie. Il s'agit de la PCR-HRM (High Resolution Melting) dont le principe est d'analyser les amplicons obtenus par PCR au moyen d'une courbe de fusion de grande précision. Après une étape de PCR en temps réel classique réalisée avec un intercalant fluorescent, une montée progressive en température permet de séparer deux populations d'amplicons courts de température de fusion différente, ne différant que par une seule base nucléotidique.

Douze marqueurs représentatifs des sous-groupes phylogénétiques présents en France ont ainsi été validés *in silico* et *in vitro* (Girault *et al.*, 2014a; Girault *et al.*, 2014b). Ils permettent d'affiner le typage des souches et confirmer l'origine (géographique) locale des souches isolées lors de foyers.

Analyse rétrospective des récents épisodes majeurs de FC

La France a récemment connu deux épisodes importants de FC: en 2008 dans le Doubs et en 2009 en Savoie (Calavas *et al.*, 2008; Madani *et al.*, 2009). Les souches impliquées dans ces épisodes appartiennent aux lignées A.Br.001/002 et B.Br.CNEVA, respectivement.

L'analyse génétique *a posteriori* des souches du Doubs démontre le caractère strictement clonal des bactéries impliquées dans les dix-sept foyers concomitants de FC de l'épisode de 2008, ainsi que dans le foyer de 2011 du Doubs. Sur les vingt-quatre souches françaises de la lignée A.Br.001/002 séquencées par l'Anses, vingt et une provenaient des foyers de 2008 et 2011 dans le Doubs. Contrairement aux trois autres souches issues de la collection de l'institut Pasteur (CIP), il n'existe que très peu, voire pas du tout, de variabilité au sein des souches du Doubs (un maximum de deux SNP de différence a été identifié parmi les 21 souches). Toutes les souches sont regroupées en un complexe clonal. À l'inverse, les trois souches de la collection de l'Institut Pasteur (CIP), plus anciennes, dont le département d'isolement est inconnu, sont bien distinctes entre elles et très éloignées phylogénétiquement des souches du Doubs, avec plus de 100 SNP de différence (Figure 2). Le génotypage détaillé confirme l'hypothèse émise à l'époque d'une résurgence multifocale de spores liée aux conditions météorologiques particulière de 2008 (Calavas *et al.*, 2008). Il renseigne en outre que l'évolution génétique des spores conservées dans cette région est particulièrement statique, la souche de 2011 étant identique au génotype majeur rencontré en 2008.

L'analyse génétique des souches collectées dans les Alpes démontre quant à elle, une bien plus grande hétérogénéité au sein de la population de spores de *B. anthracis* dans cette région, même si presque toutes les souches des Alpes (quels que soient leur lieu d'isolement et l'année) présentent une parenté forte entre elles. Cette observation est en faveur d'un ancêtre commun ayant évolué localement et de manière distincte aux souches de la lignée B.Br.CNEVA retrouvées dans d'autres massifs montagneux. L'épisode de 2009 de Savoie (17 foyers de FC confirmés sur une quinzaine de communes limitrophes) implique différents génotypes très apparentés mais présentant autant de différences (SNP) entre souches que celles qu'on peut observer avec des souches isolées dans la même vallée en 1997 ou dans d'autres localisations (foyers de 2000, 2006 et 2007), suggérant une histoire de FC plus ancienne dans les Alpes.

Conclusions

Le séquençage d'un grand nombre de génomes combiné à l'identification exhaustive des polymorphismes de type SNP qu'ils contiennent a permis de cartographier avec une grande précision les divers génotypes de *B. anthracis* présents en France. Un outil de typage résolutif, basé sur une technique de PCR a été développé. Il permet de déterminer l'origine géographique probable de n'importe quelle souche de FC présente sur le sol français et d'établir rapidement sa filiation génétique avec tout autre foyer.

Bien que les coûts de séquençage d'un génome bactérien complet soient en constante diminution, le séquençage systématique des souches isolées au cours des foyers de FC n'est pas envisageable (dans un proche avenir). Disposer d'une large banque de données génomiques représentative de la diversité rencontrée sur un territoire est, de ce fait, fort utile pour toute investigation épidémiologique. Cela permet en outre de mettre rapidement en évidence tout événement inhabituel impliquant des génotypes « inattendus » qui nécessiterait de plus amples investigations.

Le maintien de la mémoire des épisodes survenus dans une région et la cartographie des terrains sur lesquels des animaux atteints de FC ont été détenus est un autre aspect essentiel. Tant que des spores persisteront dans les sols, la maladie sera susceptible de ré-émerger périodiquement en ces endroits. Il convient donc de maintenir une sensibilisation vis-à-vis de la FC à l'échelle locale, tant les conséquences en termes de santé animale et de santé humaine peuvent être importantes, nécessitant une surveillance et une prise en charge adaptées.

Remerciements

Les auteurs remercient Nora Madani (Anses) pour l'accès aux souches du LNR fièvre charbonneuse ainsi que la plateforme de séquençage à haut débit IMAGIF (Centre de Recherche de Gif-sur-Yvette (<http://www.imagif.cnrs.fr>)). Ce travail a été financé par l'Agence nationale de recherche (ANR) et la Direction générale de l'armement (DGA) (projet ANR11ASTR0007). Guillaume Girault est un doctorant co-financé par l'Anses et la DGA.

Références bibliographiques

- Calavas, D., Sala, C., Vaissaire, J., Condé, J., Thien-Aubert, H., Hessemann, M., Woronoff-Rehn, N., 2008. Retour d'expérience sur un épisode de fièvre charbonneuse chez les bovins dans le Doubs au cours de l'été 2008. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 32 32, 1-6.
- Derzelle, S., Laroche, S., Le Fleche, P., Hauck, Y., Thierry, S., Vergnaud, G., Madani, N., 2011. Characterization of genetic diversity of *Bacillus anthracis* in France by using high-resolution melting assays and multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4286-4292.
- Fediaevsky, A., Madani, N., Garin-Bastuji, B., Moutou, F., 2009. Bilan de la surveillance de la fièvre charbonneuse en 2009: détection de quelques foyers sporadiques. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 40, 1-2.
- Girault, G., Blouin, Y., Vergnaud, G., Derzelle, S., 2014a. High-throughput sequencing of *Bacillus anthracis* in France: investigating genome diversity and population structure using whole-genome SNP discovery. *BMC genomics* 15.
- Girault, G., Thierry, S., Cherchame, E., Derzelle, S., 2014b. Application of high-throughput sequencing: discovery of informative SNPs to subtype *Bacillus anthracis*. *Adv Biosci Biotechnol* 5, 669-677.
- Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Shupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E., 2000. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *J. of Bacteriology* 182, 2928-2936.
- Keim, P.S., Wagner, D.M., 2009. Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nature reviews. Microbiology* 7, 813-821.
- Madani, N., Mendy, C., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., 2009. La fièvre charbonneuse en France. Épisodes de l'été 2009 et foyers enregistrés sur la dernière décennie (1999-2009). *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 38, 1-3.
- Marston, C.K., Allen, C.A., Beaudry, J., Price, E.P., Wolken, S.R., Pearson, T., Keim, P., Hoffmaster, A.R., 2011. Molecular epidemiology of anthrax cases associated with recreational use of animal hides and yarn in the United States. *PLOS ONE* 6, e28274.
- OIE, 2008. Anthrax in humans and animals.
- Vaissaire, J., Mock, M., Le Doujet, C., Levy, M., 2001. Le charbon bactérien. *Epidémiologie de la maladie en France. Médecine et maladies infectieuses* 31, 257-271.
- Van Ert, M.N., Easterday, W.R., Huynh, L.Y., Okinaka, R.T., Hugh-Jones, M.E., Ravel, J., Zanecki, S.R., Pearson, T., Simonson, T.S., U'Ren, J.M., Kachur, S.M., Leadem-Dougherty, R.R., Rhoton, S.D., Zinser, G., Forlow, J., Coker, P.R., Smith, K.L., Wang, B., Kenefic, L.J., Fraser-Liggett, C.M., Wagner, D.M., Keim, P., 2007. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. *PLOS ONE*.