

Université du Québec
Institut National de Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier (INRS-IAF)

**INHIBITION DES FACTEURS DE VIRULENCE DE *CLOSTRIDIODES*
DIFFICILE PAR LES PROBIOTIQUES *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS CL1285, *L. CASEI* LBC80R ET *L. RHAMNOSUS* CLR2**

Par
Sathursha Gunaratnam

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès *Sciences* (M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Étienne Yergeau, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	George Szatmari, Ph.D. Département de microbiologie, infectiologie et immunologie Université de Montréal
Directeur de recherche	Monique Lacroix, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Mathieu Millette, Ph.D. Bio-K Plus International Inc.

« A man has always to be busy with his thoughts if anything is to be accomplished »

Antonie Van Leeuwenhoek

« Let the food be your medicine and medicine be your food »

Hippocrates

À mes parents pour leur appui et leurs encouragements!

À mon fiancé, Thavakumar Nadarajah, pour son amour inconditionnel et ses encouragements !

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier Professeure Lacroix de m'avoir accueilli pour que j'y poursuive des études de 2^e cycle en microbiologie appliquée. J'aimerais aussi grandement remercier mon co-directeur de recherche Mathieu Millette. L'opportunité de faire un stage de fin de baccalauréat dans son laboratoire avec une équipe formidable m'a donné le goût de poursuivre des études au 2e cycle. Grâce à ton support et tes conseils, j'ai réussi à atteindre la fin! Merci Mathieu de m'avoir offert tant d'opportunités où j'ai eu la chance d'enrichir mes connaissances!

Je voudrais remercier une autre personne qui a été d'un grand support durant ma maîtrise; Patrick Paquette, chargé de projet chez Bio-K+. Patrick m'a non seulement rendue plus confiante mais aussi avec plus d'initiative; Je suis maintenant capable de mener un projet à terme. Aussi, un gros merci à Julie Auclair, scientifique de recherche chez Bio-K+, qui a toujours eu le temps pour un petit cinq minutes lorsque j'arrivais à l'improviste avec un problème à régler. Merci à toute l'équipe de recherche préclinique chez Bio-K+, votre passion pour la microbiologie aura été contagieuse. Je tiens à remercier Martin Frappier et Samir Bouasker, tous deux d'excellents scientifiques au sein de l'entreprise. Votre disponibilité et vos précieux conseils durant mon parcours sont grandement appréciés. Merci à Julie Payet, technicienne de laboratoire, pour m'avoir formé aux techniques de laboratoire au début de mon stage de fin de baccalauréat.

Aussi Stéphane Salmieri, assistant de recherche au labo du Prof Lacroix, toujours disponible pour m'aider. J'aimerais dire un gros merci à plusieurs stagiaires dont Martin Gélinas, Myriam Coutu (maintenant assistante de recherche pour Bio-K+), Valérie Robichaud, Catherine Barrette et Carine Diarra : vous avez tous et toutes été un gros appui dans l'avancement du projet! Vous avez tous et toutes contribué à l'aboutissement du projet. Aussi, à Riham Zahra, étudiante au doctorat, pour son encouragement constant et ses conseils.

Merci aux chercheurs du groupe de microbiologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier, mais particulièrement aux professeurs Jonathan Perreault et Frederick Veyrier qui m'ont tout le temps ouvert leur porte lorsque j'avais des questions.

Merci à Bio-K Plus International Inc. pour m'avoir accueilli au sein de leur entreprise et de m'avoir donné la chance de faire un stage de 2e cycle chez eux, ainsi que tous les employés qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma maîtrise. Je remercie le CRSNG et la compagnie Bio-K Plus International Inc. qui grâce à leur support financier, ont permis l'avancement du projet. Merci à ma famille pour votre support et vos encouragements.

RÉSUMÉ

Le microbiote intestinal est constitué de milliards de microorganismes formant un écosystème complexe. Celui-ci influence l'homéostasie de son hôte et exerce plusieurs rôles bénéfiques tels que la résistance à la colonisation, la maturation du système immunitaire et la sécrétion de peptides antimicrobiens. Lorsque l'équilibre du microbiote intestinal est perturbé (dysbiose) par une prise d'antibiotique, des bactéries pathogènes telles que *Clostridioides (Clostridium) difficile* peuvent croître et engendrer des infections. La consommation de probiotiques pourrait prévenir les dysbioses et réduire les risques d'infection à *C. difficile* (ICD). La formulation composée de *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 est connue et supportée par de nombreuses études cliniques pour aider à réduire l'incidence des ICD. Cependant, les mécanismes d'action restent à être élucidés. L'hypothèse émise est que cette combinaison de lactobacilles inhiberait la bactérie *C. difficile* et atténuerait ses facteurs de virulence plus précisément sa production de toxines. L'objectif principal du projet est de démontrer que cette combinaison spécifique de probiotique affecte *C. difficile* et ses facteurs de virulence au-delà de l'acidification de l'environnement. Les résultats ainsi obtenus suggèrent que 1) le glucose favorise la sécrétion d'acide lactique par les souches probiotiques ce qui inhibe la croissance de *C. difficile* et empêche la sécrétion des toxines; 2) en absence de glucose et en contrôlant la sécrétion d'acide lactique, les lactobacilles n'affectent pas la croissance de *C. difficile* mais inhibent tout de même la synthèse de ses toxines A et B. De plus, ce phénomène d'interférence avec la pathogenèse de *C. difficile* semble dépendant de la présence et de la viabilité des lactobacilles. En résumé, il est possible d'affirmer que la fermentation lactique est un mécanisme d'action important par lequel la formulation probiotique *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 neutralise la virulence de *C. difficile*, mais ce n'est pas le seul. En effet, même en absence de la sécrétion d'acide lactique, la présence des lactobacilles dans l'environnement permet d'atténuer la sécrétion des toxines de *C. difficile*.

Mots-clés : probiotiques, *Clostridium difficile*, *Clostridioides difficile*, *Lactobacillus*, infections à *C. difficile*, *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2, microbiote, dysbiose

ABSTRACT

The intestinal microbiota is composed of billions of microorganisms forming a complex ecosystem. It influences the homeostasis of the host and plays several beneficial roles such as colonization resistance, immune system maturation and secretion of antimicrobial peptides. Therefore, when the balance of the gut microbiota is disturbed by antibiotic usage, pathogenic bacteria such as *Clostridioides (Clostridium) difficile* can grow and cause infections. Consumption of probiotics may prevent dysbiosis and reduce the risk of *C. difficile* infections (CDI). A specific formulation comprising *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 is known to help reduce the incidence of diarrhea associated to CDI. However, the mechanism of action remains to be elucidated. The hypothesis is that this combination of lactobacilli inhibits *C. difficile* and mitigates its virulence factors more precisely its toxin secretion. The main objective of the project is to demonstrate that this specific probiotic combination affects *C. difficile* growth and its virulence factors excluding acidification. The results suggest that 1) glucose promotes the secretion of lactic acid by probiotic strains which inhibits the growth and toxin secretion of *C. difficile*; 2) in the absence of glucose and by controlling the secretion of lactic acid; lactobacilli do not affect the growth of *C. difficile* but still inhibits the synthesis of its toxins A and B. Moreover, this ability to interfere with *C. difficile* pathogenesis seems to depend on the presence and viability of the strains. At the end of the project, it is possible to confirm that lactic fermentation is an important mechanism of action by which the formulation comprising *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 neutralizes *C. difficile* virulence factors, but it's not the only one. In the absence of lactic acid secretion, the presence of lactobacilli in the environment allows to attenuate toxin secretion in *C. difficile*.

Keywords : probiotics, *Clostridium difficile*, *Clostridioides difficile*, *Lactobacillus*, *C. difficile* infections, *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2, microbiota, dysbiosis

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVI
PREMIERE PARTIE SYNTHÈSE	1
1 INTRODUCTION	3
1.1 LE MICROBIOTE INTESTINAL.....	3
1.2 LA BACTERIE <i>C. DIFFICILE</i>	8
1.2.1 <i>Épidémiologie</i>	8
1.2.2 <i>Mode de transmission</i>	9
1.2.3 <i>Les facteurs de risques</i>	9
1.2.4 <i>Les symptômes</i>	10
1.2.5 <i>Les traitements</i>	11
1.2.6 <i>Récurrence des infections à C. difficile</i>	14
1.2.7 <i>Pathogénèse des infections à C. difficile</i>	15
1.2.8 <i>Virulence de C. difficile</i>	17
1.3 LES PROBIOTIQUES.....	21
1.3.1 <i>Qu'est-ce qu'un probiotique ?</i>	21
1.3.2 <i>Rôles des probiotiques</i>	23
1.3.3 <i>Les probiotiques efficaces contre C. difficile</i>	24
1.4 BUT, HYPOTHESES ET OBJECTIFS	26
DEUXIEME PARTIE ARTICLES	31
2 ARTICLE DE RÉSULTATS	33
2.1 RESUME.....	35
2.2 ABSTRACT.....	36
2.3 INTRODUCTION	37
2.4 MATERIAL AND METHODS	38
2.4.1 <i>Bacterial strains</i>	38
2.4.2 <i>Growth kinetics</i>	38
2.4.3 <i>Microbial analysis</i>	39
2.4.4 <i>Quantification of toxins A/B</i>	39

2.4.5	<i>Cytotoxicity assay</i>	40
2.4.6	<i>Statistical analysis</i>	40
2.5	RESULTS.....	41
2.5.1	<i>Inhibition of toxin synthesis in high glucose medium</i>	41
2.5.2	<i>Toxin secretion inhibition in low glucose medium</i>	41
2.5.3	<i>Toxin secretion inhibition in glucose-depleted medium</i>	42
2.5.4	<i>Cytotoxicity assay</i>	42
2.6	DISCUSSION.....	43
2.6.1	<i>Funding</i>	45
2.6.2	<i>Acknowledgments</i>	45
3	RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	51
3.1	METHODE	51
3.1.1	<i>Conditions de culture</i>	51
3.1.2	<i>Effet des souches probiotiques sur les protéines de toxines de C. difficile</i>	53
3.1.3	<i>Préfermentation du milieu de culture par les souches probiotiques et impact sur le taux d'expression des toxines de C. difficile</i>	54
3.1.4	<i>Importance de la viabilité des souches probiotiques dans leur capacité à réduire le taux d'expression des toxines de C. difficile</i>	54
3.1.5	<i>Séquestration intracellulaire des toxines de C. difficile lorsque C. difficile est exposé aux souches probiotiques</i>	54
3.1.6	<i>Optimisation de l'extraction de l'ARN de C. difficile</i>	55
3.2	RESULTATS.....	57
3.2.1	<i>Effet des souches probiotiques sur les protéines de toxines de C. difficile</i>	57
3.2.2	<i>Préfermentation du milieu de culture par les souches probiotiques et impact sur le taux d'expression des toxines de C. difficile</i>	58
3.2.3	<i>Importance de la viabilité des souches probiotiques dans leur capacité à réduire le taux d'expression des toxines de C. difficile</i>	60
3.2.4	<i>Optimisation de l'extraction de l'ARN de C. difficile</i>	62
4	DISCUSSION	67
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	71
6	CAN PROBIOTICS INTERFERE WITH THE QUORUM SENSING SYSTEM OF CLOSTRIDIODES DIFFICILE?	73
6.1	ABSTRACT.....	75
6.2	RESUME.....	76
6.3	MICROBIOTA, NEXT-GENERATION PROBIOTICS AND COLONIZATION RESISTANCE	77
6.4	QUORUM SENSING	78
6.5	QS OF <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i>	80

6.6	QS INHIBITION STRATEGIES.....	82
6.7	PROBIOTICS	85
6.8	CONCLUSION.....	87
6.8.1	<i>Funding</i>	88
7	BIBLIOGRAPHIE.....	95
8	ANNEXE I.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES D'ACTION DIRECTS ET INDIRECTS PERMETTANT LA RESISTANCE A LA COLONISATION (KAMADA & NUNEZ, 2013)..... 7
FIGURE 1.2.0	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PATHOGENESE D'UNE INFECTION A <i>C. DIFFICILE</i> . DANS LA PORTION A GAUCHE, UNE COLONISATION PAR <i>C. DIFFICILE</i> DUE A UNE DYSBIOSE INTESTINALE EST OBSERVABLE. LA PORTION DU CENTRE PRESENTE UNE LIBERATION DES TOXINES A ET B ET LE RECRUTEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES AU SITE DE L'INFECTION. DANS LA PORTION DE DROITE, IL EST POSSIBLE D'OBSERVER LA PROGRESSION DE L'INFECTION, LE DEVELOPPEMENT D'UN SITE INFLAMMATOIRE ET D'UNE PSEUDOMEMBRANE (MCCOLLUM & RODRIGUEZ, 2012).. 17
FIGURE 1.2.1	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU LOCUS DE PATHOGENICITE (PALOC). SUR CE DERNIER, SE TROUVE LES GENES QUI CODENT POUR LES TOXINES A (ENTEROTOXINE) ET B (CYTOTOXINE), SOIT <i>TCDA</i> ET <i>TCDB</i> . CE LOCUS TRANSCRIT AUSSI TROIS AUTRES GENES ACCESSOIRES SOIT LE GENE <i>TCDR</i> , UN FACTEUR SIGMA QUI EST UN REGULATEUR POSITIF POUR L'EXPRESSION DES TOXINES ET LE GENE <i>TCDC</i> , UN FACTEUR ANTI-SIGMA QUI EST UN REGULATEUR NEGATIF QUI CONTROLE L'EXPRESSION DES TOXINES. LE GENE <i>TCDE</i> EST AUSSI PRESENT SUR LE LOCUS. IL CODE POUR UNE PROTEINE LYTIQUE (BOUILLAUT <i>ET AL.</i> , 2015). 19
FIGURE 1.2.2	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EFFETS PRODUITS PAR DES METABOLITES OU PROTEINES REGULATEURS SUR LA SYNTHESE DES TOXINES DE <i>C. DIFFICILE</i> (MARTIN-VERSTRAETE <i>ET AL.</i> , 2016). 21
FIGURE 1.3	RESUME DES MECANISMES D'ACTION POTENTIELLEMENT EMPLOYES PAR LES PROBIOTIQUES POUR LUTTER CONTRE LES BACTERIES PATHOGENES (BERMUDEZ-BRITO <i>ET AL.</i> , 2012) 24
FIGURE 2.1	<i>IN VITRO</i> MODEL OF <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i> R20291 GROWTH KINETICS WHEN CULTURED ALONE OR IN THE PRESENCE OF <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> CL1285, <i>L. CASEI</i> LBC80R AND <i>L. RHAMNOSUS</i> CLR2 IN MEDIUM CONTAINING GLUCOSE (RCM BROTH) LEADING TO ACIDIFICATION OF THE MEDIUM. (■) GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> MONOCULTURE ; (□) PH OF <i>C. DIFFICILE</i> MONOCULTURE; (●) GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> AFTER CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> WITH THE THREE LACTOBACILLI (LB); (○) PH OF THE CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> WITH THE THREE LACTOBACILLI. GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> WAS MEASURED BY PLATE COUNT ON CYCLOSERINE-CEFOXITIN FRUCTOSE AGAR (CCFA) UNDER ANAEROBIC CONDITIONS AFTER 48H AT 37°C. THIS EXPERIMENT WAS CARRIED OUT IN TRIPLICATE.*INDICATES THAT THE GROWTH VALUES OF THE CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> WITH LACTOBACILLI ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM THE MONOCULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> . + INDICATES THAT THE PH VALUES OF THE CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> WITH LACTOBACILLI ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM THE MONOCULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> 46
FIGURE 2.2	<i>IN VITRO</i> MODEL OF <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i> R20291 GROWTH KINETICS IN CO-CULTURE WITH OR WITHOUT <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> CL1285, <i>L. CASEI</i> LBC80R AND <i>L. RHAMNOSUS</i> CLR2 IN MEDIUM WITH LOW GLUCOSE (BHI BROTH) LIMITING ACID PRODUCTION IN THE MEDIUM. (■) GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> MONOCULTURE; (□) PH OF <i>C. DIFFICILE</i> MONOCULTURE; (●) GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> AFTER CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> WITH THE THREE LACTOBACILLI; (○) PH OF THE CULTURE <i>C. DIFFICILE</i> WITH THE THREE LACTOBACILLI. GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> WAS MEASURED BY PLATE COUNT ON CCFA AGAR UNDER ANAEROBIC CONDITIONS AFTER 48H AT 37°C. THIS EXPERIMENT WAS CARRIED OUT IN TRIPLICATE. *INDICATES THAT THE VALUES ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM THE MONOCULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> . + INDICATES THAT THE PH VALUES ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM THE MONOCULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> 47
FIGURE 2.3	<i>IN VITRO</i> MODEL OF <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i> R20291 GROWTH KINETICS IN CO-CULTURE WITH OR WITHOUT <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> CL1285, <i>L. CASEI</i> LBC80R AND <i>L. RHAMNOSUS</i> CLR2 IN MEDIUM WITHOUT GLUCOSE (TY BROTH) LIMITING ACID PRODUCTION IN THE MEDIUM. (■) GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> MONOCULTURE; (□) PH OF <i>C. DIFFICILE</i> MONOCULTURE; (●) GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i> AFTER CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> WITH THE THREE LACTOBACILLI; (○) PH OF THE CULTURE <i>C. DIFFICILE</i> WITH THE THREE LACTOBACILLI. GROWTH OF <i>C. DIFFICILE</i>

WAS MEASURED BY PLATE COUNT ON CCFA AGAR UNDER ANAEROBIC CONDITIONS AFTER 48H AT 37°C. THIS EXPERIMENT WAS CARRIED OUT IN TRIPLICATE. *INDICATES THAT THE VALUES ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM THE MONOCULTURE OF *C. DIFFICILE*. + INDICATES THAT THE PH VALUES ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM THE MONOCULTURE OF *C. DIFFICILE*..... 48

FIGURE 2.4	% OF TOXIN A AND B REDUCTION AFTER 24HRS IN AN <i>IN VITRO</i> MODEL OF <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i> R20291 CO-CULTURED WITH OR WITHOUT <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> CL1285, <i>L. CASEI</i> LBC80R AND <i>L. RHAMNOSUS</i> CLR2. CULTURES WERE CULTIVATED IN AN ACIDIFYING MEDIUM WITH LOW CONCENTRATION OF GLUCOSE AND IN AN NON ACIDIFYING MEDIUM WITHOUT GLUCOSE (BHI & TY BROTH). FIGURE 2.4.A REPRESENTS % OF TOXIN A AND B DECREASE IN CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> IN BHI BROTH (). FIGURE 2.4.B REPRESENTS % OF TOXIN A AND B DECREASE IN CO-CULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> IN TY BROTH (■). THIS EXPERIMENT WAS CARRIED OUT IN TRIPLICATE. IN ALL CONDITIONS BELOW THE CONCENTRATION OF TOXIN A AND B IN THE CO-CULTURE WAS SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM THE MONOCULTURE OF <i>C. DIFFICILE</i> 49
FIGURE 3.1	SCHEMA REPRESENTANT LES ETAPES A SUIVRE AFIN DE PREPARE LE SURNAGEANT DE TOXINES DE <i>C. DIFFICILE</i> 53
FIGURE 3.2	TAUX D'EXPRESSION DES TOXINES LORSQUE CD R20291 EST CULTIVE DANS DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TY PREFERMENTE PAR LES SOUCHES BIO-K+ OU PAR UNE COMBINAISON DE CES SOUCHES AVEC CD R20291 DANS UN MODELE DE CO-CULTURE ANAEROBIE EN TUBES A 37°C DURANT 24H. LE TAUX D'EXPRESSION DES TOXINES (A) A ETE MESURE A L'AIDE D'UN ESSAI DE DETECTION IMMUNOENZYMATIQUE QUANTITATIF (« ELISA FOR SEPARATE DETECTION OF <i>C. DIFFICILE</i> TOXIN A OR B IN SUSPENSION® »). DES MESURES DE PH ET DES DENOMBREMENTS BACTERIENS ONT EGALEMENT ETE REALISES..... 59
FIGURE 3.3	CROISSANCE DE CD R20291 DANS UNE (i) CO-CULTURE DANS DU TY AVEC LES SOUCHES BIO-K VIVANTES, DANS (ii) UNE CULTURE DE SOUCHES BIO-K+ STERILISEE PAR UNE EXPOSITION AUX RAYONS GAMMA DE 9 KGY AVEC UN DOSE RATE DE 10,679 KGY/H (IRRADIATED) ET DANS (ii) UNE CULTURE DE SOUCHES BIO-K+ CHAUFFEE DURANT 10 MIN A 100°C. LES TROIS CULTURES ONT ETE INCUBEES EN CONDITION ANAEROBIE A 37°C DURANT 24 H. LE TAUX D'EXPRESSION DES TOXINES (A) A ETE MESURE A L'AIDE D'UN ESSAI DE DETECTION IMMUNOENZYMATIQUE QUANTITATIF (« ELISA FOR SEPARATE DETECTION OF <i>C. DIFFICILE</i> TOXIN A OR B IN SUSPENSION® »). DES MESURES DE PH ET DES DENOMBREMENT BACTERIEN ONT EGALEMENT ETE REALISES (B). 61
FIGURE 3.4	VISUALISATION, APRÈS MIGRATION PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE DÉNATURANT, DE L'EXTRACTION D'ARN PROVENANT DES ÉCHANTILLONS RECUEILLIS D'UNE CULTURE DE <i>C. DIFFICILE</i> SEUL (CD), <i>C. DIFFICILE</i> + SOUCHES PROBIOTIQUES BIO-K+ (CD+LB) ET SOUCHES PROBIOTIQUES BIO-K+ SEULES (LB) APRÈS 6 ET 18 HEURES ET EN DUPLICATA. L'EXTRACTION A ÉTÉ FAITE AVEC LE KIT QIAGEN. 63
FIGURE 3.5	VISUALISATION APRES MIGRATION PAR ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE DENATURANT, DE L'EXTRACTION D'ARN PROVENANT DES ÉCHANTILLONS RECUEILLIS D'UNE CULTURE DE <i>C. DIFFICILE</i> SEUL (CD) APRÈS 6 ET 18 HEURES ET EN DUPLICATA. 64
FIGURE 7.1	TARGETS IN THE LIFE CYCLE OF <i>C. DIFFICILE</i> FOR THERAPEUTIC USE ADAPTED FROM SHEN <i>ET AL</i> 2015 (SHEN, 2015)..... 89
FIGURE 7.2	THE AGR SYSTEM IN <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> AND THE POTENTIAL TARGETS. THE AGR SYSTEM IS COMPOSED OF TWO AGR LOCI: <i>AGR1</i> AND <i>AGR2</i> . <i>AGR1</i> IS AN INCOMPLETE LOCUS WHICH CONTAINS THE PROPEPTIDE <i>AGRD1</i> AND THE TRANSMEMBRANE PROTEIN <i>AGRB1</i> , PRESENT IN ALL STRAINS OF <i>C. DIFFICILE</i> . THE <i>AGRB1</i> IS RESPONSIBLE OF PROCESSING THE <i>AGRD1</i> IN ORDER TO SECRETE AIP MOLECULES. <i>AGR2</i> IS A COMPLETE LOCUS FOUND IN CERTAIN STRAINS OF <i>C. DIFFICILE</i> WHICH IS COMPOSED OF THE PROPEPTIDE, <i>AGRD2</i> ; A TRANSMEMBRANE PROTEIN RESPONSIBLE FOR THE PROTEOLYSIS OF THE PROPEPTIDE, <i>AGRB2</i> ; A RESPONSE REGULATOR COMPOSED OF <i>AGRA2</i> AND A HISTIDINE SENSOR KINASE <i>AGRC2</i> . AFTER THE PROCESSING OF THE PROPEPTIDE INTO AIP MOLECULES, WHEN A THRESHOLD IS MEET, COMMUNICATION SIGNAL MOLECULE ACTIVATES <i>AGRC2</i> WHICH PHOSPHORYLATES <i>AGRA2</i> . PHOSPHORYLATED <i>AGRA2</i> INITIATES TRANSCRIPTION OF AGR GENES AND GENES RELATED TO

THE VIRULENCE OF *C. DIFFICILE* SUCH AS TOXINS AND FLAGELLAR SYSTEM. SEVERAL STEPS OF THE SIGNALLING PATHWAY CAN BE BLOCKED SUCH AS (A) THE SYNTHESIS OF AIP (B) INHIBITION OF THE COMMUNICATION MOLECULES BY ANALOGUES OR ANTIBODIES (C) BLOCKING THE BINDING OF AIP TO THE SENSORY HISTIDINE KINASE (AGRC2) (D) THE PHOSPHORYLATION OF THE RESPONSE REGULATOR (AGRA2) (ILLUSTRATED BY USING SOMERSAULT) 90

FIGURE 9. CINÉTIQUE DE CROISSANCE DE *C. DIFFICILE* R20291 DANS LE MILIEU TY ET LA PRODUCTION DE TOXINES A ET B MESURÉES DANS LE TEMPS INCUBÉ À 37°C, ANAÉROBIE 108

LISTE DES TABLEAUX

TABLE 2.0	CYTOTOXICITY ASSAY OF CELL-FREE SUPERNATANT FROM 24 H OF CO-CULTURE WITH OR WITHOUT <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> CL1285, <i>L. CASEI</i> LBC80R AND <i>L. RHAMNOSUS</i> CLR2 IN TY MEDIUM ON HUMAN FIBROBLASTS. AFTER ADDING THE SUPERNATANT RESULTS WERE TAKEN AFTER 4H OF INCUBATION AT 37°C WITH CO ₂	50
TABLEAU 3.0	AMORCES CIBLANT LES GÈNES DE RÉFÉRENCE OU GÈNES DE VIRULENCE DE <i>C. DIFFICILE</i> UTILISÉ DANS LES ESSAIS D'EXPRESSION UTILISÉ DANS LES ÉTUDES D'EXPRESSION DE GÈNE	57
TABLEAU 3.1	LES CONDITIONS DES REACTIONS PCR TEMPS REEL CFX-96 EMPLOYEES	57
TABLEAU 3.2	QUANTIFICATION DES PROTEINES DE TOXINES A ET B DE <i>C. DIFFICILE</i> APRES 24H D'EXPOSITION AUX SOUCHES PROBIOTIQUES DANS LE MILIEU TY	58
TABLEAU 4.	BILAN D'EFFICACITÉ ET DE LA SPÉCIFICITÉ DES AMORCES	65
TABLE 7.3	NONANTIMICROBIAL TARGETS TO TREAT OR PREVENT CDI.....	91
TABLE 7.7	PROBIOTICS KNOWN TO INTERFERE WITH QS OF BACTERIA.....	92

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AEBSF : 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
ASPC : Agence de la santé publique du Canada
ARN : Acide ribonucléique
BHI: *Brain Heart Infusion*
CCFA: *Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar*
DAA : Diarrhée associée aux antibiotiques
DACD : Diarrhée associée à *Clostridioides difficile*
DO : Densité optique
ICD : Infection à *Clostridioides difficile*
INSPQ: Institut national de santé publique du Québec
IPP : Inhibiteurs des pompes à protons
mL : Millilitre
mm : Millimètre
MRS: de Man, Rogosa, Sharpe
nm : Nanomètre
PaLoc: locus de pathogénicité
PBS : “*Phosphate buffered saline*”
pH : Potentiel d'hydrogène
RCM: *Reinforced Clostridium Medium*
RT-qPCR : *Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction*
TBE: Tris/Borate/EDTA
TY: *Tryptose Yeast Extract*
UFC : Unité formatrice de colonies
 μ L : Microlitre
 μ M : Micromètre

Première partie

SYNTHÈSE

1 INTRODUCTION

Le présent mémoire traitera des travaux de recherches en microbiologie et biologie moléculaire, qui ont été effectués afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des probiotiques pour prévenir les infections à *Clostridioides (Clostridium) difficile* (ICD). Pour bien illustrer la problématique de ce projet, un survol des principes de bases du microbiote intestinal, des ICD et des probiotiques sera présenté. Dans un deuxième temps, le but, les hypothèses du projet et les objectifs spécifiques seront abordés. Dans un troisième temps, les résultats seront présentés sous forme d'article et les résultats préliminaires seront présentés dans un prochain chapitre. Finalement, une discussion sera entamée et se terminera par la conclusion et les perspectives.

1.1 Le microbiote intestinal

Vers la fin du 19^e et le début du 20^e siècle, de nombreux membres de la flore intestinale humaine, maintenant nommé le microbiote intestinal, ont été identifiés comme des agents responsables d'un certain nombre d'infections humaines. Par exemple, *Staphylococcus aureus* a été isolé, par Friedrich Rosenbach en 1884, d'une plaie chirurgicale infectée (Cowan *et al.*, 1954). Cependant, à l'époque, la connaissance sur la composition du microbiote humain ou animal était très restreinte. Initialement, personne ne s'était rendu compte que ces bactéries nouvellement reconnues en tant que pathogènes étaient en fait régulièrement présentes chez certains voire tous les êtres humains en bonne santé. Par la suite, à mesure que la connaissance sur le microbiote s'est enrichie, il est devenu de plus en plus intéressant de faire des recherches approfondies sur ses effets bénéfiques et néfastes dans la santé humaine. Plus récemment, il a été découvert que non seulement des membres individuels du microbiote peuvent provoquer une maladie, mais que des changements dans la composition globale du microbiote d'un site tel que l'intestin peuvent entraîner différentes maladies.

Notre microbiote intestinal regroupe des micro-organismes pathogènes et non-pathogènes qui forment un écosystème complexe qui est en grande partie responsable de notre santé. Le microbiote humain contient 10^{14} microorganismes, représentant 10

fois le nombre de cellules constituant le corps humain et plus de 150 fois le nombre de gènes retrouvés dans l'ensemble du génome humain (Perez-Cobas *et al.*, 2015). Le microbiote intestinal est de loin le plus abondant et le plus diversifié, alors qu'on peut dénombrer près de 10^{12} bactéries par gramme de fèces. Récemment, un groupe a démontré que le nombre de bactéries est en réalité très similaire au nombre de cellules humaines. Ils ont réévalué le rapport B/H (nombre de bactéries/nombre de cellules humaines) qui était largement cité (10:1) et ont conclu à un ratio de 1.3:1 (Sender *et al.*, 2016). Dans leur étude, les auteurs ont estimé la quantité de bactéries et le nombre de cellules humaines chez un homme de 20-30 ans qui pèse 70 kg et mesure 170 cm, considéré comme une personne moyenne. Les scientifiques ont réussi à démontrer qu'il y a $3,0 \times 10^{13}$ cellules humaines et de $3,8 \times 10^{13}$ bactéries dans le corps (Sender *et al.*, 2016).

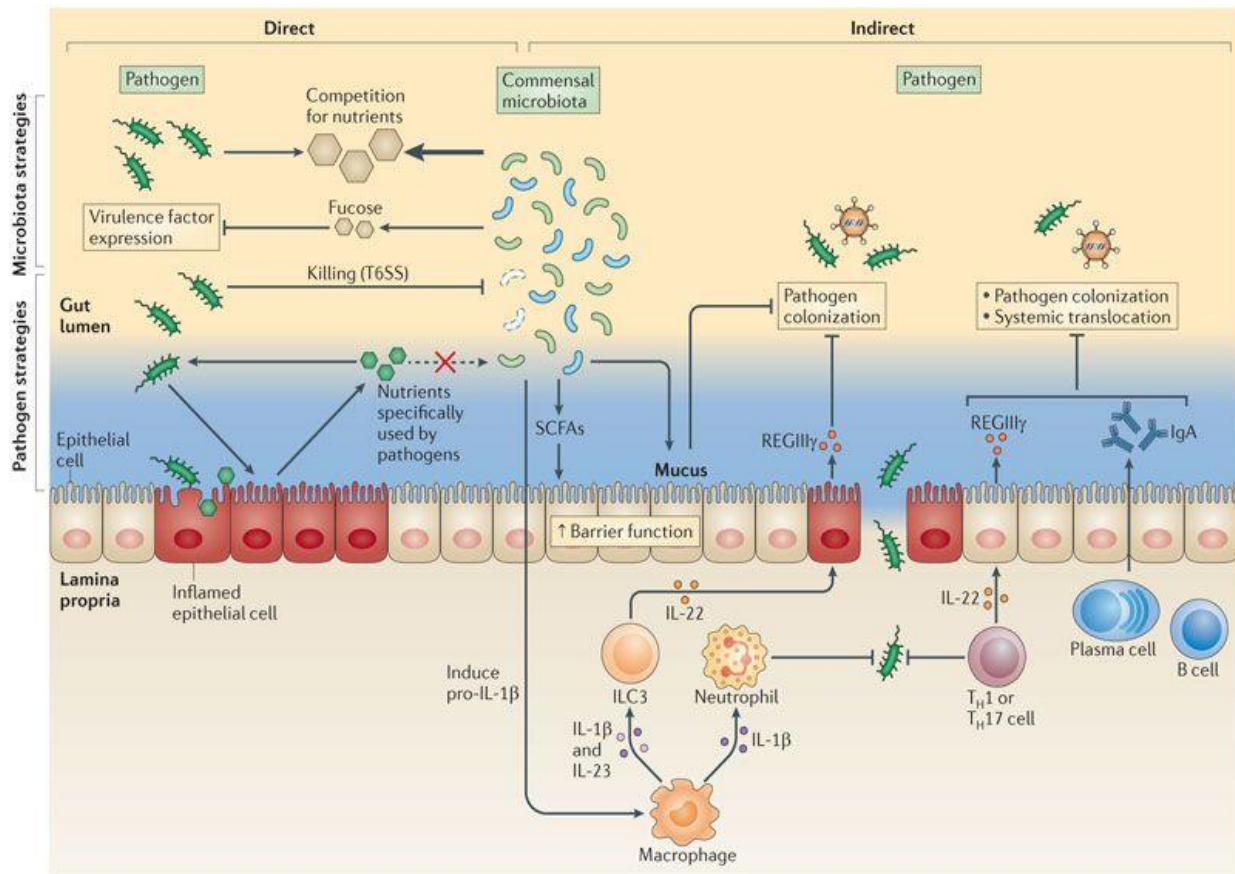
Le tractus gastro-intestinal humain est un système très complexe qui commence par la cavité buccale, le larynx, l'œsophage, se poursuit dans l'estomac et les diverses sections des intestins, et se termine finalement à l'anus. La densité et la composition du microbiote varie en fonction des conditions physico-chimiques et des nutriments disponibles tout au long du tractus gastro intestinal. Dans le passé, seulement 100-300 espèces bactériennes étaient identifiées dans le microbiote intestinal (Eckburg *et al.*, 2005). Maintenant, avec le développement des outils moléculaires et d'analyses bio-informatiques sophistiquées, le catalogue bactérien de cet écosystème comprend plus de 1952 espèces différentes (Almeida *et al.*, 2019). Jusqu'à tout récemment les études sur le microbiote étaient majoritairement axées sur les bactéries; cependant de plus en plus d'études récentes démontrent que des levures, des moisissures, des virus et des protozoaires forment une part importante de ce microbiote intestinal, contribuent à la dynamique de l'écosystème et interagissent étroitement avec la physiologie et le système immunitaire de l'hôte (Hillman *et al.*, 2017). La composition du microbiote intestinal est unique et peut varier selon la génétique de l'hôte, son régime alimentaire et son âge (Claesson *et al.*, 2011). Deux principaux embranchements bactériens composent l'essentiel du microbiote intestinal : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*. De plus, il y a aussi les Actinobactéries, les Protéobactéries et les Verrumicrobias qui peuvent être présent en grande quantité. À une faible proportion, il est possible de

trouver les Fusobactéries, les Tenericutes, les Spirochaetes, les Cyanobactéries, les Archées et les Saccharibactéries (anciennement les TM7) (Hillman *et al.*, 2017). Les espèces présentes en faible proportion varient d'un individu à un autre. Même avec les avancements technologiques, il n'est toujours pas possible de définir les espèces de bactéries composant le microbiote intestinal parfait. Les bactéries présentes au sein du tractus gastro intestinal exercent plusieurs fonctions bénéfiques pour la santé. Les membres du microbiote produisent des acides gras à chaînes courtes (AGCC) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate qui interviennent dans la croissance et la différenciation des cellules épithéliales et la modulation du système immunitaire. Ils peuvent aussi être impliqués dans la dégradation des hydrates de carbone et des sucres complexes qui sont indigestibles par l'hôte. Il joue aussi un rôle métabolique en favorisant la digestion et la transformation des aliments digérés ainsi qu'en produisant des vitamines. L'une des principales fonctions du microbiote est d'empêcher les bactéries pathogènes de coloniser la muqueuse intestinale.

Ce phénomène est nommé résistance à la colonisation (Buffie & Pamer, 2013). Afin de maintenir l'équilibre dans le microbiote intestinal, les microorganismes emploient des mécanismes directs et indirects. Les mécanismes directs sont les interactions microbes-microbes (voir Figure 1.1) (Lawley & Walker, 2013). Les microorganismes du microbiote intestinal essaient de séquestrer les nutriments pour eux-mêmes afin d'éviter la concurrence et l'invasion par les bactéries étrangères. De plus, la muqueuse intestinale agit comme une barrière (Juge, 2012). Les pathogènes doivent réussir à traverser l'épaisse couche de mucine afin d'atteindre les récepteurs d'adhésion sur l'épithélium intestinal. Les métabolites issus des fonctions métaboliques exercées par le microbiote peuvent aussi inhiber la croissance et l'expression des facteurs de virulence des pathogènes. La sécrétion des AGCC, l'utilisation d'O₂ et la sécrétion d'acides organiques (acide lactique, acide acétique,...), qui permet la réduction locale du pH, sont des mécanismes directs afin de contrer les intrus (Cherrington *et al.*, 1991; Duncan *et al.*, 2009). Par exemple, l'exposition de *Salmonella enterica* au butyrate diminue

l'expression de ses facteurs de virulence et diminue sa capacité à envahir et induire l'apoptose des cellules hôtes ce qui est une étape cruciale afin d'induire l'inflammation intestinale (Gantois *et al.*, 2006).

Les mécanismes indirects, qui sont plutôt les interactions microbe-hôte, sont médiés par la stimulation du système immunitaire ou par la sécrétion de métabolites par les membres du microbiote (voir Figure 1.1) (Lawley & Walker, 2013). Les récepteurs tels que « *Toll-like receptor* » (TLRs) et « *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor* » (NODs) sont situés à la surface des cellules de l'hôte ou dans certains organites et reconnaissent les bactéries du microbiote ou l'ensemble des molécules produites par les membres du microbiote tels que les protéines, nucléotides ou lipopolysaccharides (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Ces récepteurs permettent de maintenir une homéostasie de la muqueuse intestinale. Lorsqu'ils perçoivent la présence de pathogènes, elles activent une cascade d'activité qui permet d'activer le système immunitaire (Lawley & Walker, 2013).



Nature Reviews | Immunology

Figure 1.1 Représentation schématique des mécanismes d'action directs et indirects permettant la résistance à la colonisation (Kamada & Nunez, 2013).

Toutefois, cet équilibre intestinal peut être perturbé par l'alimentation, le vieillissement ou la prise d'antibiotiques. Ceci a un impact direct sur les différents métabolites libérés lors de la digestion des nutriments et le métabolisme des bactéries intestinales. La prise d'antibiotiques est un facteur de risque majeur pour le développement de la diarrhée associée aux antibiotiques (DAA) (Hickson, 2011). Ceux-ci perturbent l'équilibre du microbiote intestinal, ce qu'on appelle une dysbiose, causant une altération du métabolisme microbien des glucides et de l'activité antimicrobienne des bactéries du côlon (Hogenauer *et al.*, 1998). La réduction de la fermentation des sucres diminue la concentration des AGCC et augmente la pression osmotique, réduit l'absorption de l'eau par l'intestin et provoque une diarrhée liquide (Hickson, 2011). Tous ces phénomènes perturbent la diversité microbienne intestinale, ce qui favorise la propagation de bactéries pathogènes telles que *C. difficile* (Willing *et al.*, 2011).

1.2 La bactérie *C. difficile*

C. difficile est une bactérie en forme de bacille, anaérobie stricte, sporulante, à Gram positif retrouvée dans le microbiote intestinal de 2 à 5 % des adultes en santé et chez 10 à 20 % des personnes âgées de 65 ans et plus (ASPC, 2014). Cette bactérie vit en équilibre avec les autres microorganismes du microbiote intestinal sans les affecter. Cependant, les infections à *C. difficile* (ICD) sont une importante cause de morbidité et de mortalité chez les patients hospitalisés (ASPC, 2014). L'infection par cette bactérie se fait lorsque le microbiote intestinal est altéré par la prise d'antibiotique. Cette altération du microbiote aide la bactérie à établir une infection qui implique une colonisation de l'épithélium entérique et la sécrétion de toxines provoquant une inflammation intestinale et la nécrose des cellules épithéliales du côlon. Cette infection cause des diarrhées qui peuvent être simplement des selles molles sans grande conséquence ou être très fréquentes et contenir du sang (Barnett, 2012). Dans les cas où la situation persiste et s'aggrave, la bactérie peut causer des colites pseudomembraneuses. Ces colites se caractérisent par une inflammation et une nécrose cellulaire plus sévères. Lors des examens cliniques, la présence de toxines dans les selles, produites par *C. difficile*, peuvent être retrouvées chez les patients qui souffrent de colites. Ces toxines détruisent la muqueuse intestinale ce qui peut mener à la mort.

1.2.1 Épidémiologie

Selon l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ, 2018), 2152 cas de diarrhées associées à *C. difficile* (DACD) nosocomiales ont été rapportés entre 1^{er} avril 2017 et le 31 mars 2018 dans les 90 centres hospitaliers universitaires et non universitaires ayant participé à la surveillance des DACD. Durant cette période, le taux d'incidence des DACD nosocomiales a été de 4,39 cas par 10 000 jours-présence et la mortalité dans les hôpitaux fut de 232 décès dans les 30 jours d'hospitalisation. Les ICD

engendrent des coûts important pour le système de santé canadien qui dépense plus de 51 millions de dollars par année en frais directs pour gérer les ICD, sans compter les frais reliés aux honoraires professionnels et ceux associés aux personnes qui sont hébergées dans les centres de soins de longue durée (INSPQ, 2015). Aux États-Unis (É.-U.), les dépenses de santé reliées à la gestion des ICD s'élève à plus de 4,8 milliards de dollars par année (CDC, 2015). On estime qu'il y a environ 500 000 cas d'ICD et 29 000 décès annuellement, et le nombre de cas ne fait qu'augmenter d'année en année aux É.-U. (Lessa *et al.*, 2015). Le nombre de cas d'ICD associées à une forte mortalité a connu une hausse en Amérique du Nord et en Europe depuis le début des années 2000 (O'Brien *et al.*, 2007). Cette augmentation pourrait être expliquée par la propagation d'une souche hyper-virulente nommée BI-NAP1-027 (*North American pulsed field (NAP) type 1*) (O'Brien *et al.*, 2007).

1.2.2 Mode de transmission

Malgré qu'il s'agisse d'une bactérie anaérobie stricte, c'est-à-dire qu'elle ne tolère pas l'oxygène, la bactérie *C. difficile* est très persistante dans l'environnement puisqu'elle produit des spores qui lui permettent de survivre dans des conditions hostiles (ASPC, 2014). La transmission de *C. difficile* se fait par voie fécale-orale (ASPC, 2014). Ce type de contamination se produit par contact indirect entre un hôte réceptif, tel qu'un patient hospitalisé, et une surface contaminée par des spores (mains souillées, instruments médicaux mal nettoyés, aliments contaminés, etc...) (ASPC, 2014).

1.2.3 Les facteurs de risques

La prise d'antibiotique est un facteur de risque majeur pour le développement d'une ICD (Hickson, 2011). Selon la dose d'antibiotiques, sa classe, son spectre d'action et la durée de l'antibiothérapie, un patient aura plus ou moins de risque de développer une ICD (Ananthakrishnan, 2011). Toutefois, la consommation de médicaments tels que les inhibiteurs des pompes à protons (IPP) est aussi considérée comme un facteur de risque pour le développement d'une ICD (Cadle *et al.*, 2007). En effet, les IPP réduisent l'acidité gastrique ce qui permettrait à *C. difficile* de survivre au passage gastrique et de rejoindre l'intestin (Surawicz, 2007).

Par ailleurs, il est important de noter que tous les antibiotiques peuvent déséquilibrer le microbiote intestinal (Barnett, 2012), incluant une dose prophylactique avant une chirurgie (Barnett, 2012), mais que seulement certains d'entre eux favorisent les ICD (Barnett, 2012). Les classes d'antibiotiques qui augmentent le plus les risques de développer une ICD sont les pénicillines, les céphalosporines, les lincosamides et les fluoroquinolones (Kelly & LaMont, 2008). À ce propos, la consommation de fluoroquinolones augmente particulièrement les risques de développer une ICD, puisque ce sont des antibiotiques à très large spectre connus pour altérer significativement le microbiote intestinal et pour lesquels *C. difficile* présente généralement une forte résistance (Barnett, 2012). Le risque de contracter une ICD augmente aussi avec l'âge et avec la durée d'un séjour à l'hôpital ou dans un centre d'hébergement et de soins de longue durée, où de nombreux cas peuvent déclencher des éclosions (Loo *et al.*, 2011).

Les personnes âgées, les femmes en péripartum (la période comprise entre le 9^e mois de grossesse et ceux qui suivent l'accouchement) (Rouphael *et al.*, 2008), les personnes immunodéprimées et les enfants sont les personnes les plus à risque (Ananthakrishnan, 2011). Les personnes âgées sont des gens plus sensibles aux infections puisque leur système immunitaire est affaibli (Hookman & Barkin, 2009). En vieillissant, le microbiote intestinal change modifiant ainsi la proportion de bactéries intestinales qui nous protègent. Il y a également les jeunes enfants (moins de 2 ans) qui sont considérés comme vulnérables aux ICD, car leur système immunitaire n'est pas suffisamment développé (McDonald *et al.*, 2018). Les personnes avec une immunodéficiences sont une population hautement à risque (McDonald *et al.*, 2018). En effet, le système immunitaire de ces patients est non-fonctionnel ou moyennement fonctionnel ce qui permet la prolifération de bactéries opportunistes telle que *C. difficile*.

1.2.4 Les symptômes

Les ICD se caractérisent par plusieurs signes cliniques et symptômes dont des nausées, de la fièvre, une perte d'appétit et des crampes dans le bas de l'abdomen (Barnett, 2012; Rodriguez *et al.*, 2016). Lorsqu'une ICD progresse, les patients ont des épisodes de diarrhées fulgurantes et nauséabondes (Barnett, 2012). Une diarrhée se

caractérise par au moins trois selles liquides par jour pendant au moins deux jours. Du mucus pourrait être présent dans les selles ainsi que du sang (Barnett, 2012). Toutefois, la présence de sang est une condition plutôt rare en début d'infection (Barnett, 2012). Après une évaluation en laboratoire, il est possible d'observer une leucocytose et une hypoalbuminémie (DuPont *et al.*, 2008). La leucocytose est caractérisée par une quantité anormalement élevée de globules blancs dans le sang. Ainsi, lorsqu'un patient souffre d'une ICD, une plus grande prolifération de globules blancs est le signe que l'organisme combat un agent pathogène et tente d'éliminer les toxines (Barnett, 2012). Lors d'une ICD, les patients atteints souffrent souvent d'un hypoalbuminémie, c'est-à-dire une baisse du taux d'albumine dans l'organisme. L'albumine est la protéine la plus abondante dans le sang. Elle est produite par le foie, sert de nutriments pour les tissus, transporte les hormones, les vitamines, les médicaments, les ions et aide à la rétention de l'eau dans les vaisseaux sanguins. Dans le cas d'une inflammation, le foie produit moins d'albumine à cause de la présence de diverses protéines inflammatoires. Généralement, ces patients ont 15 à 30 épisodes de diarrhées par jour et une hypotension avec un taux de créatinine élevé (DuPont *et al.*, 2008).

1.2.5 Les traitements

Un antibiotique est une substance naturelle ou synthétique possédant la capacité d'interférer avec la croissance des micro-organismes (van Hoek *et al.*, 2011). Dans le passé, les antibiotiques généralement prescrits pour traiter les ICD étaient la vancomycine, le métronidazole ou une combinaison des deux (Ananthakrishnan, 2011). Ces deux antibiotiques étaient habituellement donnés pour le traitement primaire des ICD (Ananthakrishnan, 2011). La vancomycine fait partie de la famille des glycopeptides (van Hoek *et al.*, 2011). Cette famille d'antibiotique bactéricide agit en inhibant la synthèse de la paroi de peptidoglycane des bactéries empêchant ainsi leur prolifération (van Hoek *et al.*, 2011). Le métronidazole est un antibiotique dit bactériostatique, faisant partie de la famille des nitroimidazoles et inhibant la synthèse des acides nucléiques, ce qui inhibe la multiplication des bactéries (van Hoek *et al.*, 2011). Auparavant, le métronidazole et la vancomycine avaient une efficacité similaire

(Cohen *et al.*, 2010). Cependant, une étude récente a montré une diminution de l'efficacité du métronidazole chez les patients atteints d'ICD sévère (Zar *et al.*, 2007). Le pourcentage de guérison était de 76% pour le métronidazole et de 97% pour la vancomycine. (Zar *et al.*, 2007). La diminution de l'efficacité du métronidazole pourrait être expliquée par une résistance acquise par le *C. difficile* (Barnett, 2012).

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques à l'aide de différents mécanismes (van Hoek *et al.*, 2011). Elles peuvent diminuer leur perméabilité membranaire par la fermeture des pores de la membrane par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Elles peuvent aussi refouler les antibiotiques avec des pompes à efflux, les inactiver à l'aide d'enzymes, modifier la cible de l'antibiotique au niveau cellulaire ou encore introduire des mutations dans le gène qui code pour la cible (van Hoek *et al.*, 2011).

En 2018, *The Society for Healthcare Epidemiology of America* et l'*Infectious Diseases Society of America* (SHEA-IDSA), suggère que les ICD soient traités par la prise de vancomycine et de fidaxomicine (McDonald *et al.*, 2018). Le dosage suggéré est de 125 mg de vancomycine oralement 4 fois par jour ou 200 mg de fidaxomicine 2 fois par jour pendant 10 jours. La fidaxomicine est un agent bactéricide à spectre étroit qui vise les bactéries Gram positif anaérobies. Cet antibiotique est dit non-systémique, c'est-à-dire qu'il est peu absorbé par la circulation sanguine. De ce fait, il permet l'éradication sélective de *C. difficile* en limitant la perturbation du microbiote intestinal (Barnett, 2012).

Selon SHEA-IDSA, la première étape pour le traitement des ICD est l'arrêt de la prise d'antibiotique qui est à l'origine de la DACD et l'administration d'un traitement de vancomycine pendant une semaine si le cas est grave (Cohen *et al.*, 2010). Si les médecins choisissent de poursuivre la thérapie, il est conseillé d'utiliser la vancomycine ou la fidaxomicine à la place du métronidazole (McDonald *et al.*, 2018). Au début d'une infection non sévère, dans les cas où la vancomycine et la fidaxomicine est limitée, la prise de métronidazole (500 mg oralement 3 fois par jour pendant 10 jours) est conseillée (McDonald *et al.*, 2018). Dans les cas de colites (une inflammation du côlon) ou de colectasie (une dilatation du côlon), une colectomie pourrait être la meilleure solution pour sauver la vie du patient (Cohen *et al.*, 2010). Une colectomie est l'ablation

d'une partie ou de la totalité du côlon par intervention chirurgicale. La colectomie est envisagée dans les cas où il y a une inflammation chronique, qui cause une destruction de l'intestin et dans certains cas d'inflammation du côlon comme la sigmoïdite, la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique (Hookman & Barkin, 2009).

Depuis les dernières années, de nouveaux antibiotiques tels que la rifaximine et la téicoplanine sont en évaluation dans le traitement des ICD (Barnett, 2012). La rifaximine, qui agit en inhibant la synthèse des protéines, est plutôt utilisée comme traitement pour les patients qui souffrent de diarrhées du voyageur. Quant à la téicoplanine, il s'agit d'un glycopeptide similaire à la vancomycine qui agit en diffusant dans la paroi bactérienne et se liant aux disaccharides-penta peptides, empêchant leur polymérisation et entraînant l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne (Shea & Cunha, 1995). Son spectre antibactérien est semblable à celui de la vancomycine, mais avec une plus grande efficacité sur les entérocoques (Shea & Cunha, 1995). Ainsi, ces traitements, comparé à la vancomycine, sont considérés plus efficaces contre les ICD et réduisent la récurrence des ICD. Cependant, la rifaximine et la téicoplanine n'ont pas encore été approuvées aux É.-U. puisque ces deux antibiotiques semblent favoriser l'apparition de résistance chez de nombreuses bactéries (Ananthkrishnan, 2011).

Une autre des solutions proposées, mais réservée aux patients souffrant d'ICD sévère, est le recours aux perfusions de selle (communément appelé le *fecal transplant*). La transplantation fécale implique le transfert de matières fécales d'un individu en santé vers le patient via une colonoscopie ou un tube nasoduodénil et un lavement rectal. Ce traitement est utilisé afin de restaurer le microbiote intestinal et traiter les cas de multi récurrence d'ICD ou chez des patients qui ne répondent pas bien aux traitements conventionnels (Salkind, 2010). Jusqu'à présent de nombreuses études ont démontré que la transplantation fécale est un traitement efficace chez les patients présentant de multiples récurrences d'ICD (Quraishi *et al.*, 2017; van Nood *et al.*, 2013). Le pourcentage de guérison après une perfusion pour les cas d'ICD est à 95.6% (Lai *et al.*, 2019). Le risque d'une récurrence dans les 8 semaines après traitement d'antibiotique standard est de 15-25% et s'élève à 40-65% pour les patients qui ont des récurrences multiples (Baktash *et al.*, 2018). Après une analyse de la séquence du gène codant

pour l'ARNr 16S, il a été démontré que le microbiote intestinal des patients avec des récurrences avaient un microbiote avec une composition bactérienne très variable par rapport à la prédominance normale de Bacteroidetes et Firmicutes (Baktash *et al.*, 2018). Après une transplantation fécale, une augmentation de la diversité alpha est souvent observée chez les patients avec une baisse des membres de la famille *Enterobacteriaceae* (Kang *et al.*, 2017). Ainsi, une transplantation fécale pourrait permettre de reconstituer un microbiote intestinal varié et robuste. Cependant, cette affirmation a été remise en question après que le groupe Ott *et al.* (2017) ait démontré qu'un filtrat stérile de matière fécale (donc exempt de tous microorganismes) était capable de traiter les récurrences aux ICD (Ott *et al.*, 2017). Cette étude n'a pas encore été répétée dans une étude randomisée. Ainsi, il est un peu prématuré de tirer des conclusions définitives. Bref, la transplantation fécale semble jouer plusieurs rôles : restauration d'un microbiote intestinal diversifié, restauration du niveau d'acides gras à chaîne courte et le métabolisme des acides biliaires (Seekatz *et al.*, 2018).

La réussite du traitement a également été observée chez les patients ayant reçu des anticorps monoclonaux avec de la vancomycine ou du métronidazole (Lowy *et al.*, 2010). Plusieurs autres traitements expérimentaux sont en cours d'évaluation tel que l'utilisation de probiotiques (Salkind, 2010), d'agents liant les toxines (Salkind, 2010) ou des immunoglobulines intraveineuses (Barnett, 2012).

1.2.6 Récurrence des infections à *C. difficile*

L'un des principaux problèmes associés à une ICD est sa récurrence (Johanesen *et al.*, 2015). En effet, 30% de patients qui ont souffert d'une ICD sont à risque de développer une infection récurrente au cours des huit semaines suivant le premier diagnostic (Johanesen *et al.*, 2015). Dans cette population, 60% des patients auront des multiples épisodes de récurrence (Johanesen *et al.*, 2015). Près de 25% des patients qui ont été traités avec le métronidazole ou la vancomycine ont des symptômes de récurrence après avoir complété quatre semaines d'antibiothérapie (Johanesen *et al.*, 2015).

Plusieurs facteurs de risques sont associés à la récurrence des ICD. L'âge du patient, la durée de son hospitalisation, l'admission des patients dans une unité de soins intensifs ou certaines comorbidités telles que des problèmes rénaux, un usage excessif d'antibiotiques dans le passé (céphalosporines), une utilisation récente d'antibiotique ainsi qu'une utilisation des IPP (Hookman & Barkin, 2009).

1.2.7 Pathogénèse des infections à *C. difficile*

Les ICD peuvent être d'origine endogène ou exogène (Peniche *et al.*, 2013). Les individus porteurs de *C. difficile* peuvent avoir une infection d'origine endogène. Les infections d'origine exogène sont causées par une contamination par voie fécale-orale. Dans les deux cas, l'infection est déclenchée lors d'une dysbiose intestinale, c'est-à-dire un déséquilibre dans le microbiote intestinal (Peniche *et al.*, 2013). En effet, lors d'une dysbiose, la population bactérienne de l'intestin est moins diversifiée, ce qui permet la propagation de bactéries pathogènes, telle que *C. difficile*, et génère de l'inflammation (Peniche *et al.*, 2013). Les infections exogènes, provenant d'une source externe, sont généralement dues à une contamination par des professionnels de la santé qui peuvent véhiculer malgré eux des spores lorsqu'ils prodiguent des soins aux patients (Peniche *et al.*, 2013). La germination des spores est un processus déclenché lors d'une limitation de nutriments (Abt *et al.*, 2016). La phosphorylation de la protéine de sporulation A stage 0 (SpoOA) par une histidine kinase active une cascade de signaux qui permet la création d'une préspore dans la cellule mère de la bactérie (Abt *et al.*, 2016). Après la lyse, la spore est relâchée dans l'environnement. Le noyau de la spore contient le chromosome condensé et encapsulé par trois couches soit le cortex, le manteau, et l'exosporium (Abt *et al.*, 2016). Les spores sont dans tous les cas ingérées oralement. Très résistantes à l'acide gastrique, les spores traversent l'estomac jusqu'au petit intestin. Dans le petit intestin, lors de l'exposition aux acides biliaires primaires tel que le taurocholate, les spores germent et se transforment en cellules végétatives (Peniche *et al.*, 2013). Lorsque le taurocholate se lie au récepteur CspC qui se trouve à la surface de la spore, l'activation de l'enzyme SleC est amorcée par CspB qui cause la dégradation du cortex et le développement en cellule végétative. Lorsque la cellule

végétative de *C. difficile* arrive dans le caecum, elle peut proliférer et coloniser la muqueuse intestinale selon l'état de santé du patient (Peniche *et al.*, 2013). Lors d'une dysbiose, la perte de l'abondance et de la diversité du microbiote intestinal va réduire le taux de conversion des sels biliaires primaires en sels biliaires secondaires normalement effectué par le microbiote (Taur & Pamer, 2014). Puisque les sels biliaires secondaires inhibent la croissance des cellules végétatives de *C. difficile*, en cas de dysbiose, celles-ci vont entrer dans une phase de croissance chez un patient colonisé et déclencher une infection (Figure 1.2.0). Ainsi, les cellules végétatives de *C. difficile* s'infiltreront dans la couche de mucus de la paroi de l'intestin. Dès lors, la bactérie devient métaboliquement active et sécrète les toxines A et B (Peniche *et al.*, 2013). Le système immunitaire détecte les toxines et déclenche des signaux intracellulaires d'activation. Elles vont ensuite produire des médiateurs protéiques solubles appelés cytokines, responsables de la communication entre les populations leucocytaires, de leur activation et de leur recrutement au site de l'infection (Pothoulakis *et al.*, 1998). Les anticorps produits par les cellules immunitaires neutralisent les toxines, tout en s'agglutinant sur les antigènes de *C. difficile*. Cela permet aux leucocytes activés de phagocyter les bactéries causant l'infection. Par ailleurs, la réaction immunitaire causera une inflammation des tissus, la mort cellulaire et la formation d'une pseudomembrane. Tous ces dommages résultent en une colite pseudomembraneuse qui peut mener à la mort de l'individu infecté (Peniche *et al.*, 2013). Dans le cas contraire, les cellules végétatives attendent en phase de dormance les conditions propices à une prolifération et une colonisation subséquente de l'intestin.

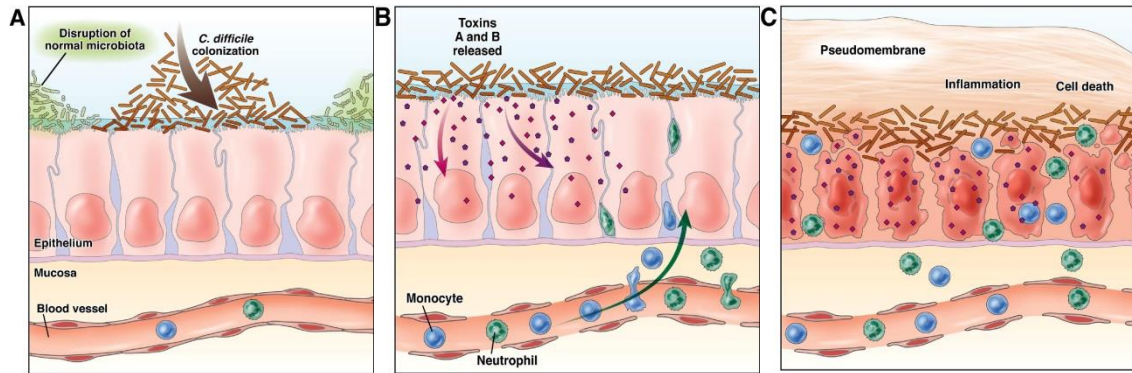


Figure 1.2.0 Représentation schématique de la pathogénèse d'une infection à *C. difficile*. Dans la portion à gauche, une colonisation par *C. difficile* due à une dysbiose intestinale est observable. La portion du centre présente une libération des toxines A et B et le recrutement des cellules immunitaires au site de l'infection. Dans la portion de droite, il est possible d'observer la progression de l'infection, le développement d'un site inflammatoire et d'une pseudomembrane (McCollum & Rodriguez, 2012).

1.2.8 Virulence de *C. difficile*

Les souches de *C. difficile* pouvant causer des ICD secrètent principalement deux toxines, soit la toxine A et la toxine B (Carter *et al.*, 2012). La toxine A fait partie de la famille des entérotoxines et la toxine B, quant à elle, fait partie de la famille des cytotoxines (Carter *et al.*, 2012). Les deux toxines agissent en synergie et cause une inflammation en détruisant les tissus épithéliaux intestinaux (Lyerly *et al.*, 1985). La toxine A est transcrite par le gène *tcdA* et la toxine B par le gène *tcdB* (Braun *et al.*, 1996). Ces gènes sont localisés dans un îlot de pathogénicité chromosomique appelé PaLoc (Abt *et al.*, 2016).

Le domaine CROP (*combined repetitive oligopeptide repeat*) de TcdA se lie sur les hydrates de carbone de la face apicale des cellules épithéliales, tandis que *tcdB* se lie au récepteur PVRL3 (*poliovirus receptor-like 3*) exprimé sur les cellules épithéliales du côlon. Par la suite, les toxines sont internalisées dans une vésicule appelé endosome où il y a acidification. Cette acidification engendre la translocation de la protéase et de la partie enzymatique vers le cytosol. L'inositol hexakisphosphate présent dans le cytosol se lie à la toxine et active son clivage ce qui permet à la partie enzymatique de la toxine d'être relâchée dans le cytosol. Lorsque les toxines sont libérées, elles effectuent une monoglycosylation des GTPases, de la famille des protéines Rho, qui sont impliqués dans la régulation de la synthèse du cytosquelette d'actine (Johanesen

et al., 2015). La monoglycosylation cause une nécrose des cellules, une perte de l'intégrité des membranes et de l'arrondissement cellulaire (Genth *et al.*, 2008). Pendant plusieurs années, les scientifiques ont cru que la toxine A était plus virulente que la toxine B, puisque celle-ci endommage les tissus afin de permettre à la toxine B d'entrer dans les cellules. Des études réalisées chez des hamsters avaient d'ailleurs démontrées qu'une injection de la toxine A purifiée causait des signes cliniques propres à une ICD, alors qu'une injection de la toxine B purifiée ne causait pas d'effet (Lyerly *et al.*, 1985). Or, une étude plus récente a plutôt démontrée que la toxine B pouvait produire des signes cliniques propres à une ICD sans la présence de la toxine A. (Savidge *et al.*, 2003). À ce jour, le rôle synergique de ces deux toxines n'est pas clairement défini et fait toujours l'objet d'un débat. Toujours est-il que les scientifiques suggèrent d'utiliser des traitements qui cibleraient les deux toxines pour atténuer les symptômes causées par *C. difficile* (Carter *et al.*, 2012).

En plus des gènes codant pour les toxines, la région PaLoc (Figure 1.2.1) transcrit trois autres gènes accessoires : *tcdR*, *tcdC* et *tcdE* (Abt *et al.*, 2016). Les gènes accessoires *tcdR* et *tcdC* permettent la régulation de l'expression des gènes de toxines *tcdA* et *tcdB* (Carter *et al.*, 2012). Le gène *tcdR* joue le rôle du facteur sigma qui permet l'expression des gènes de toxines (Braun *et al.*, 1996). Contrairement au gène *tcdR*, le gène *tcdC* est un facteur anti-sigma qui régule négativement l'expression des gènes *tcdA* et *tcdB* en bloquant l'association du *tcdR* avec l'ARN polymérase (Matamouros *et al.*, 2007). Le gène *tcdE* code une protéine qui présente une forte homologie avec les holines, c'est-à-dire une protéine de phage (White *et al.*, 2011). Il est à noter que les protéines holines sont des protéines cytolitiques qui provoquent la lyse des bactéries hôtes pour effectuer la sortie de phages (White *et al.*, 2011). Ainsi, le gène *tcdE* pourrait perméabiliser la membrane ou fonctionner comme une protéine lytique qui faciliterait la libération de *tcdA* et *tcdB* dans l'environnement extracellulaire sans l'entremise d'un peptide signal (Tan *et al.*, 2001).

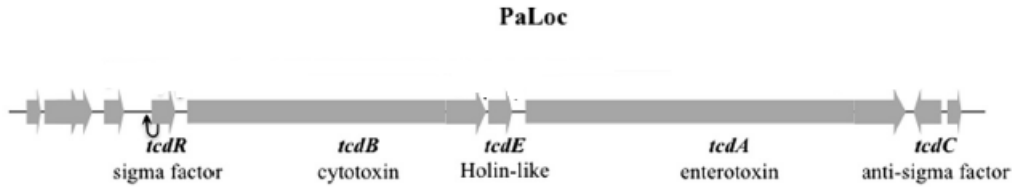


Figure 1.2.1 Représentation schématique du locus de pathogénicité (PaLoc). Sur ce dernier, se trouve les gènes qui codent pour les toxines A (entérotoxine) et B (cytotoxine), soit *tcdA* et *tcdB*. Ce locus transcrit aussi trois autres gènes accessoires soit le gène *tcdR*, un facteur sigma qui est un régulateur positif pour l'expression des toxines et le gène *tcdC*, un facteur anti-sigma qui est un régulateur négatif qui contrôle l'expression des toxines. Le gène *tcdE* est aussi présent sur le locus. Il code pour une protéine lytique (Bouillaut *et al.*, 2015).

En plus des principales toxines, *C. difficile* peut produire plusieurs autres facteurs de virulence incluant une troisième toxine nommée toxine binaire CDT, des fimbriaes, la production de *p*-crésol, de protéine de liaison de la fibronectine (FbpA) et plusieurs autres (Carter *et al.*, 2012). Cependant, le rôle principal de chacun des facteurs de virulence reste à être déterminé dans la virulence (Carter *et al.*, 2012).

La toxine binaire CDT est une ADP-ribosyltransférase spécifique de l'actine (Carter *et al.*, 2007). La CDT est codée par les gènes *cdtA* et *cdtB* qui sont localisés dans la région CdtLoc du chromosome de *C. difficile* (Carter *et al.*, 2007). Avec l'aide du gène *cdtR*, les gènes *cdtA* et *cdtB* régulent la production de la toxine binaire CDT (Carter *et al.*, 2007). Le rôle de la toxine CDT n'est pas encore défini clairement (Carter *et al.*, 2012). Cependant, certaines études avec la toxine purifiée ont démontré que celle-ci crée des protubérances dans le cytosquelette des cellules intestinales, ce qui permet à *C. difficile* d'adhérer et de se loger plus facilement dans l'intestin (Carter *et al.*, 2012).

Bref, la virulence reflète le degré de pathogénicité d'une souche (Carter *et al.*, 2012). De plus, l'intensité de la maladie varie d'une personne à une autre selon plusieurs facteurs tels que l'âge et la santé de la personne.

Plusieurs facteurs peuvent réguler à la baisse l'expression des toxines chez *C. difficile*. Tel que mentionné précédemment, le facteur sigma TcdR permet l'activation de la transcription des toxines A et B tandis que TcdC, un facteur anti-sigma permet la répression des gènes reliés aux toxines. En plus de TcdC, plusieurs facteurs peuvent réprimer la synthèse des toxines A et B chez *C. difficile*. La présence de nutriments,

plus précisément les sources de carbones et d'acides aminés présents dans l'environnement où co-habite *C. difficile*, peut jouer un rôle sur la production de toxines A et B (Martin-Verstraete *et al.*, 2016). La présence de glucose et de carbone facilement métabolisable dans le milieu de croissance réprime la production de toxines indépendamment des variations de pH dues au métabolisme du glucose (Dupuy & Sonenshein, 1998). En effet, la plupart des sources de carbone qui pourrait réprimer la synthèse de toxines sont transportés dans la bactérie par un système de phosphotransférase (PTS) (Kazamias & Sperry, 1995). Un système de « *carbon catabolite repression* » (CCR) permet à la bactérie d'assimiler les sources de carbone préféré telle que le glucose lorsqu'elle est exposé à plus qu'un hydrate de carbone de la façon la plus rentable et économique pour la cellule (Martin-Verstraete *et al.*, 2016). Chez *C. difficile*, le mécanisme principal qui contrôle CCR est le régulateur pléiotropique CcpA qui est aussi membre de la famille de répresseur LacI/GalR (Martin-Verstraete *et al.*, 2016). Le régulateur CcpA détient des gènes impliqués dans l'absorption du sucre, la fermentation et le métabolisme des acides aminés. Le taux de glucose présent dans l'environnement peut jouer un rôle dans l'activation du CcpA. En effet, la production de toxine chez *C. difficile* peut être contrôlé par le CcpA qui pourrait interagir avec la région promotrice *tcdR* ou les extrémités 5' de plusieurs gènes du locus PaLoc (Antunes *et al.*, 2012). De plus, elle peut jouer un rôle dans l'inhibition de la production de butyrate qui lui, à son tour, est un activateur de la production de toxine (Martin-Verstraete *et al.*, 2016). D'autres facteurs tels que la présence de proline, glycine et de cystéine régule négativement la synthèse de toxines (Karlsson *et al.*, 1999).

Le régulateur global de transcription CodY est aussi connu pour inhiber la synthèse des toxines chez *C. difficile* (Dineen *et al.*, 2007). L'affinité de liaison de CodY pour ses gènes cibles est favorisée en présence d'acides aminés à chaîne ramifiée (isoleucine, leucine et valine (BCAA)) et de GTP, individuellement ou en combinaison (Karlsson *et al.*, 1999). La présence de ces cofacteurs est un signe de disponibilité de nutriments dans l'environnement. Ainsi, CodY réprime *tcdR*. Cependant, lorsque les nutriments deviennent limitants, le niveau intracellulaire de BCAA et GTP est réduit, CodY n'est

plus en mesure de réprimer *tcdR*. Bref, plusieurs autres facteurs peuvent moduler la production de toxines chez *C. difficile* (voir Figure 1.2.2)

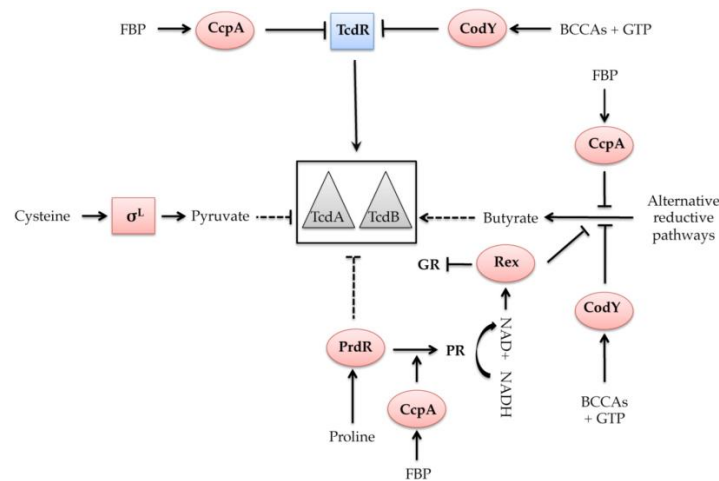


Figure 1.2.2 Représentation schématique des effets produits par des métabolites ou protéines régulateurs sur la synthèse des toxines de *C. difficile* (Martin-Verstraete *et al.*, 2016).

1.3 Les probiotiques

1.3.1 Qu'est-ce qu'un probiotique ?

En 1965, pour la première fois par Lilly et Stillwell, le mot probiotique a été utilisé en opposition à antibiotique afin de qualifier une substance microbienne capable de stimuler la croissance d'un autre micro-organisme (Lilly & Stillwell, 1965). Pendant cette période, le mot probiotique était défini comme étant un microorganisme vivant présentant des avantages pour la santé de l'hôte en modifiant l'équilibre du microbiote intestinal (Brian, 2016). Maintenant, avec la découverte de divers mécanismes d'action, l'Organisation Mondiale de la Santé a défini les probiotiques comme étant des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ingérés en quantité suffisante, produisent des effets bénéfiques sur la santé de celui qui les consomme (FAO/WHO, 2001). L'idée de bactéries bénéfiques est très ancienne. Au 12^e siècle, à l'époque de Gengis Khan, le lait fermenté était considéré comme une source d'énergie et de santé (Brian, 2016). Les femmes mongoles en aspergeaient les chevaux et les cavaliers pour les protéger pendant les combats. Au début du 20^e siècle, Elie Metchnikoff a établi une corrélation entre la longévité des Bulgares et leur consommation de lait fermenté (Metchnikoff &

Mitchell, 1908). Au cours de la même période, le pédiatre Français Henry Tissier, a observé que des nourrissons souffrant de diarrhée avaient peu de bâtonnets à Gram positif en forme de Y dans les selles, alors que ces bactéries étaient dominantes dans les selles des nourrissons en bonne santé (MH, 1906). Son observation lui a permis de suggérer aux enfants qui ont la diarrhée de prendre un à deux verres de culture de *Bacillus acidiparalactici* ou une symbiose de cette espèce avec *Bacillus bifidus* (Brian, 2016; MH, 1906). Les observations de Metchnikoff lui ont permis de comprendre les bienfaits du lait fermenté mais aussi de son composant bioactif, les bactéries. Ses observations l'ont amené à soutenir que tous les microbes ne sont pas dangereux pour la santé (Brian, 2016). Le concept des bactéries bénéfiques pour la santé a été oublié pendant l'ère de la découverte de l'antibiotique et de la vaccination; cependant maintenant, il y a un plus grand intérêt qui se développe.

Il existe quelques dizaines d'espèces de bactéries probiotiques, les plus étudiées sont les souches lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp. (FAO/WHO, 2001). Ils jouent un rôle positif sur la santé humaine en agissant sur le microbiote intestinal. Parmi les effets favorables sur la santé intestinale, mentionnons l'amélioration de la tolérance au lactose, la diminution de formation de composés carcinogènes et le contrôle des maladies inflammatoires de l'intestin (Hickson, 2011).

Afin qu'un produit soit considéré probiotique, les souches qui le composent doivent avoir certaines caractéristiques (FAO/WHO, 2001). Premièrement, ils doivent démontrer que la ou les souches réussissent à franchir l'intestin en survivant au stress physiologique durant l'ingestion, l'acide gastrique et la présence d'acide biliaire. Deuxièmement, l'effet bénéfique du probiotique doit être démontré par une étude clinique sur une population spécifique et une indication donnée. Troisièmement, ils ne doivent avoir aucun effet néfaste sur l'hôte. De plus, toutes les caractéristiques des souches doivent être stables tout au long du processus de fabrication et de stockage dans la matrice dans laquelle ils sont incorporés. Les probiotiques sont souvent isolés à partir de divers aliments fermentés ou non tels que les saucisses, viandes et légumes mais aussi du microbiote humain et animal. Les bactéries considérées probiotiques ne sont pas obligatoirement une bactérie lactique. En effet, certaines souches appartenant

aux genres *Enterococcus*, *Propionibacterium* ou *Escherichia* procurent quelques bienfaits sur la santé humaine (Brian, 2016). Les levures telles que *Saccharomyces boulardii* ont aussi été reconnues comme étant probiotique. Ainsi, les probiotiques ne sont pas seulement des bactéries. Les souches de lactobacilles, bifidobactéries, lactocoques et levures sont classées en tant que produits sécuritaires pour la santé « *Generally Regarded as Safe*» (GRAS) (Brian, 2016).

1.3.2 Rôles des probiotiques

Lorsqu'on fait une revue de littérature de la grande classe des probiotiques, c'est-à-dire sans tenir compte que l'effet d'un probiotique dépend des souches d'un produit particulier, il est possible de recenser d'innombrables bienfaits sur la santé humaine ou animale. Quelques souches ou produits probiotiques ont démontré une forte capacité à lutter contre de nombreux pathogènes. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés afin d'expliquer comment certains probiotiques spécifiques peuvent prévenir les infections telles que les ICD.

Les probiotiques ont plusieurs modes d'action. Un des principaux mécanismes d'action est l'amélioration du microbiote en renforçant la barrière intestinale (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Afin de limiter la colonisation par les bactéries pathogènes, la résistance à la colonisation est souvent employée (Hickson, 2011). Ceci inclut la sécrétion de bactériocines, de métabolites ou de tous autres biosurfactants ayant une activité antimicrobienne (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). La sécrétion d'AGCC et d'acides organiques réduit le pH et rend la croissance bactérienne des pathogènes plus ardue. Un deuxième mécanisme d'action employé par les probiotiques en activant une cascade d'activité de signalisation est l'amélioration de la muqueuse intestinale (Ohland & Macnaughton, 2010). L'augmentation de la sécrétion de défensines, de la sécrétion de mucus, et le renforcement des jonctions entre les cellules épithéliales sont des moyens utilisés par les probiotiques afin de contrer les pathogènes. Le troisième mécanisme d'action est l'activation du système immunitaire. Il est à noter que 70% des cellules immunitaires se trouve dans l'intestin, spécifiquement dans la muqueuse du

petit intestin, appelé les tissus lymphoïdes associé à l'intestin (*GALT*) (Brian, 2016). L'activation du système immunitaire se fait par l'entremise des récepteurs TLRs et NODs qui se trouve sur les cellules immunitaires innées (Lebeer *et al.*, 2010). Par la reconnaissance de certaines composantes bactériennes, l'activation des cellules lymphocytes T auxilliaires permet la différenciation en cellules Th1 et Th2 ce qui active la sécrétion des cytokines pro et/ou anti inflammatoire (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Selon la cytokine activée, un probiotique peut avoir un effet local ou systémique. Un effet local peut conduire à la sécrétion des IgAs dans la lumière intestinale. De plus, les probiotiques peuvent jouer un rôle bénéfique par la production d'enzymes telles que la bêta-galactosidase qui améliorerait les symptômes gastro-intestinaux liés à l'intolérance au lactose. Bref, les mécanismes d'action employés par les probiotiques varient d'une souche à une autre.

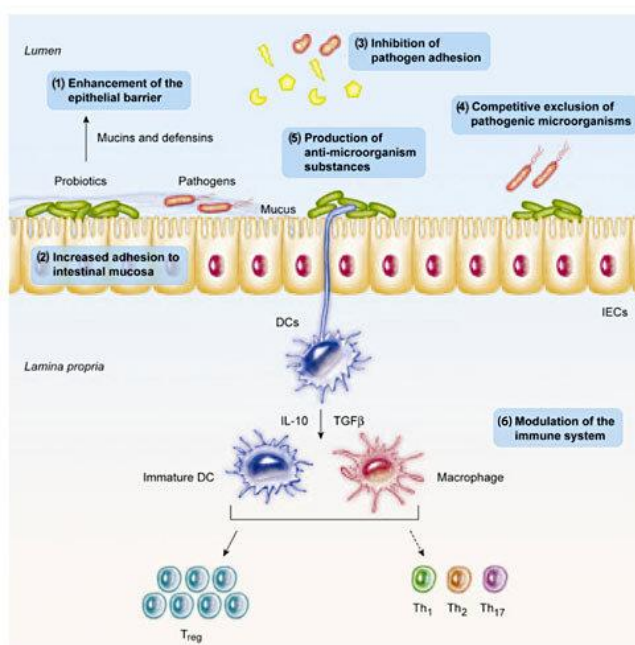


Figure 1.3 Résumé des mécanismes d'action potentiellement employés par les probiotiques pour lutter contre les bactéries pathogènes (Bermudez-Brito *et al.*, 2012)

1.3.3 Les probiotiques efficaces contre *C. difficile*

Au cours des 30 dernières années, divers probiotiques ont été étudiés afin de prévenir les ICD. Les bactéries probiotiques les plus courantes appartenait aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Giau *et al.*, 2019). De plus, la levure *Saccharomyces*

boulardii CNCM I-745 est connue pour inactiver les toxines A et B de *C. difficile* par l'entremise d'une protéase de 54 kDA. En 2000, Surawicz *et al* a réalisé une étude randomisée en double aveugle et contre placebo avec le *S. boulardii* pour le traitement des récurrences de ICD (Surawicz *et al.*, 2000). Quotidiennement, la vancomycine 500 mg, 2g ou 1g de métronidazole était administré aux patients pendant 10 jours. À la 7^e journée après leur traitement aux antibiotiques, *S. boulardii* 500mg ou placebo était administré et continué jusqu'à 28 jours. Les résultats de l'étude ont démontré que la prise de *S. boulardii* durant l'antibiothérapie a permis de réduire le pourcentage de récurrence de 50% à 16.7% (Giau *et al.*, 2019). Cependant, *S. boulardii* n'a pas eu un effet préventif sur les DAA chez les patients âgées (Pozzoni *et al.*, 2012). D'autres combinaisons tels que *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Lactobacillus plantarum* sont aussi reconnus pour contrer les ICD. Cependant, il a été récemment démontré que ce ne sont pas tous les probiotiques qui ont la capacité de coloniser l'intestin de tous les individus (Zmora *et al.*, 2018) ou d'être efficace pour retourner le microbiote à son état originel suite à une prise d'antibiotiques (Suez *et al.*, 2018). Ces deux publications laissent présager que ce ne sont pas tous les probiotiques qui peuvent aider dans la lutte contre les ICD. De plus, Goldenberg *et al* (2013) ont montré que seuls certains produits probiotiques peuvent prévenir les ICD (Goldenberg *et al.*, 2013). Aussi, McFarland *et al* (2018), ont démontré par une méta-analyse qu'un probiotique est efficace par la spécificité de la souche et pour une maladie en particulière (McFarland *et al.*, 2018a). Par exemple, dans l'étude clinique PLACIDE, un probiotique contenant quatre souches spécifiques (*Lactobacillus acidophilus* CUL60, *L. acidophilus* CUL21, *Bifidobacterium bifidum* CUL20 et *B. lactis* CUL34) a été testé sur 2 981 patients et s'est révélé inefficace à prévenir les DAA et les ICD (Allen *et al.*, 2013). De plus, il semble que le moment de prise du probiotique soit cruciale. En effet, Shen *et al.* (2017) ont récemment démontré l'importance d'administrer le probiotique le plus rapidement possible suivant la première prise d'antibiotique afin d'obtenir un effet préventif intéressant.

D'ailleurs, l'une des combinaisons possédant une très forte capacité à réduire l'incidence des DAA et des DACD chez les patients hospitalisés démontrés par trois études randomisées en double aveugle et contre placebo est la combinaison de

Lactobacillus acidophilus CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 (Bio-K+) (Giau *et al.*, 2019). Dans l'une des études cliniques (Gao *et al.*, 2010), il a été démontré que les patients qui prenaient deux capsules de ce probiotique par jour pendant la durée de l'antibiothérapie et pour les 5 jours suivants, réduisaient de 65% le risque d'avoir une DAA et de 95% le risque de développer une DACD. Ainsi, à la suite de la publication de ces résultats et du dépôt d'un dossier réglementaire, les produits Bio-K+ ont obtenus deux allégations par Santé Canada stipulant que les produits probiotiques Bio-K+ aident à réduire les risques de DAA et aident à réduire les risques de DACD chez les patients hospitalisés.

De plus, une étude observationnelle conduite à l'Hôpital Pierre-Le-Gardeur depuis maintenant plus d'une décennie, démontre que l'utilisation routinière des probiotiques Bio-K+ chez plus de 44 500 patients hospitalisés et sous antibiothérapie, a permis de maintenir le taux d'incidence des infections à *C. difficile* (ICD) parmi les plus bas au Québec selon des données recensées par l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ). Ce produit contenant les trois souches de lactobacilles a été administré aux patients 2-12h suivant la prise d'antibiotique. Ce traitement prophylactique s'est poursuivi pour la durée du traitement antibiotique et 30 jours suivant l'arrêt de l'antibiothérapie. Le taux d'ICD a été réduit de 18,0 cas par 10 000 patients/jours à une moyenne de 2,3 cas par 10 000 patients/jour. Aucun effet secondaire sévère n'a été répertorié ni de problème d'utilisation du produit par le personnel hospitalier (Maziade *et al.*, 2013).

1.4 But, hypothèses et objectifs

Depuis le début des années 2000, le nombre d'éclotions graves d'ICD sont en hausse constante, constituant ainsi un fardeau important pour le système de santé. De plus, 30% de patients qui ont souffert d'une ICD sont à risque de développer une infection récurrente (Johanesen *et al.*, 2015), laquelle est souvent associée à une perte de diversité microbienne suite à l'usage d'antibiotique. Au cours des dernières années, il y

a eu un accroissement de l'intérêt pour l'utilisation des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies. Depuis la dernière décennie, plusieurs études ont démontrés que la consommation de certains probiotiques est associée à une diminution significative du risque de développer une ICD (Goldenberg *et al.*, 2013). Jusqu'à maintenant, diverses études ont été réalisées démontrant les effets bénéfiques de la consommation des produits Bio-K+ dans la prévention primaire des DAA et des ICD (Beausoleil *et al.*, 2007; Sampalis *et al.*, 2010). Cependant, le ou les mécanisme(s) d'action employé par ce probiotique spécifique était inconnu(s). Récemment, il a été démontré que les trois souches de probiotiques avaient un effet inhibiteur sur la croissance de *C. difficile*. Ces données antérieures obtenues par des tests de diffusion radiale et d' *Agar Spot Test* ont démontré que les probiotiques inhibaient la croissance de *C. difficile* par la sécrétion d'acide lactique. Cette activité anti-*C. difficile* des souches Bio-K+ est un mécanisme d'action dit « non spécifique », car la sécrétion d'acide lactique est commune au genre *Lactobacillus* sp. (Tejero-Sarinena *et al.*, 2012). Cependant, aucun autre lactobacille n'a démontré un effet préventif contre les DACD. L'acidification lactique ne peut donc pas être le seul mécanisme d'action anti-*C. difficile* spécifiques aux trois souches. Ainsi, le mécanisme d'action employé par ce probiotique spécifique est toujours inconnu. Le but de ce projet consiste à développer les connaissances scientifiques sur les mécanismes d'action anti-*C. difficile* par lesquels la combinaison de *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 exercent une action préventive contre les DACD au-delà de l'acidification lactique.

Les hypothèses de ce travail sont les suivantes :

- I) La présence de lactobacilles inhibe la croissance de *C. difficile*;
- II) La présence de lactobacilles neutralise les toxines de *C. difficile*;
- III) La présence de lactobacilles inhibe la synthèse des toxines de *C. difficile*;
- IV) Les lactobacilles devraient être vivantes et présentes pour inhiber la synthèse des toxines de *C. difficile*;
- V) La présence de lactobacilles inhibe l'expression des gènes de toxines.

Les objectifs de ce travail sont:

- I) Confirmer que les souches de *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 inhibent la croissance de *C. difficile* par l'acidification;
- II) Démontrer que les souches probiotiques spécifiques inhibent la synthèse de toxines de *C. difficile* par l'acidification;
- III) Déterminer un moyen afin d'éliminer le facteur d'acidification lorsque *C. difficile* est co-cultivé avec les souches probiotiques;
- IV) Démontrer que les trois souches probiotiques ont un effet sur la synthèse des toxines sans que ce soit due à l'acidification;
- V) Démontrer que les trois souches de lactobacilles peuvent neutraliser les toxines de *C. difficile*;
- VI) Évaluer l'impact des souches probiotiques sur l'expression des gènes de virulence de *C. difficile*.

Les moyens pour atteindre les objectifs sont :

- I) Afin de confirmer que les souches de *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 inhibent la croissance de *C. difficile* par l'acidification, les trois souches ont été co-cultivées avec le *C. difficile* dans un bouillon riche en glucose *Reinforced Clostridial Medium* (RCM). L'effet de la fermentation lactique du glucose sur le *C. difficile* par les souches probiotiques peut être vu tel que démontrer par Tejero-Sarinera *et al* (2012);
- II) L'inhibition de la synthèse des toxines de *C. difficile* dans un milieu avec glucose a pu être démontrée par une cinétique de croissance bactérienne dans du *Brain Heart Infusion* (BHI) modifié ;
- III) L'acidification par les souches probiotiques dans un milieu riche en glucose a pu être évitée par l'utilisation d'un milieu sans glucose nommé Tryptose-Yeast Extract (TY);

- IV) La co-culture des souches probiotiques avec *C. difficile* dans un bouillon TY a permis de démontrer l'inhibition de la synthèse de toxines sans que ce soit lié au pH;
- V) Par la suite, un test de cytotoxicité (Bartel's Cytotoxicity Assay) tel que utilisé par Darkoh *et al* 2016, a été fait afin de déterminer si les résultats de quantification des toxines A/B obtenues avec un test ELISA ne serait pas due à un changement de conformation des protéines de toxine;
- VI) L'optimisation du protocole d'extraction d'ARN a été débutée afin de pouvoir extraire l'ARN de *C. difficile* pour voir l'effet sur l'expression des gènes de virulence.

Deuxième partie

ARTICLES

2 ARTICLE DE RÉSULTATS

Uncovering the acid-dependent and independent mechanisms of the probiotic comprising *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2 that diminish the virulence of *Clostridioides difficile* R20291

Auteurs :

Sathursha Gunaratnam¹, Carine Diarra², Patrick D. Paquette², Noam Ship², Mathieu Millette² et Monique Lacroix¹

¹Institut National de Recherche Scientifique- Institut Armand-Frappier (INRS-IAF)

²Bio-K Plus International Inc.

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Cet article a été soumis le 14 février 2019 au journal *Toxins*, mais il a été refusé par les éditeurs. Il a été modifié en fonction des commentaires reçus et soumis au journal *Anaerobe* le 19 février 2019. L'article a été resoumis au journal scientifique *Anaerobe* en incluant des réponses aux questions et commentaires suggérés par les réviseurs le 31 juillet 2019.

Contribution des auteurs :

SG a réalisé les expériences, l'article scientifique et participé à l'élaboration des protocoles. De plus, SG a supervisé une stagiaire, CD, qui a contribué significativement à la réalisation des expériences. MM et ML Lacroix ont été les responsables scientifiques et les coordonnateurs du projet de recherche. SG, PDP, MM, NS, ML ont discuté, interprété et révisé les résultats.

2.1 Résumé

Les infections à *Clostridioides (Clostridium) difficile* (ICD) sont un problème de santé publique important survenant lorsque l'intégrité du microbiote intestinal est affectée, par exemple suite à la prise d'antibiotiques. La formulation composée de *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2, homologué par Santé Canada pour aider à réduire l'incidence des ICD, est supportée par de nombreuses études cliniques. Cependant, le mécanisme d'action reste à être élucidé. Notre hypothèse est que cette combinaison de lactobacilles inhibe *C. difficile* par des mécanismes autres que par la sécrétion d'acides organiques. Ces mécanismes ont été étudiés dans un modèle *in vitro* de co-culture de *C. difficile* et de probiotiques. En présence de glucose, une baisse rapide du pH est corrélée à une inhibition de la croissance de *C. difficile* et des toxines. En absence de glucose, la croissance de *C. difficile* est stable, mais la sécrétion de toxines est significativement réduite de 24% pour toxine A et de 43% pour la toxine B après 24h. Ces résultats suggèrent que: 1) le glucose favorise la sécrétion d'acide lactique, ce qui inhibe la croissance de *C. difficile* et la sécrétion des toxines et ; 2) en absence de glucose, les lactobacilles n'affectent pas la croissance de *C. difficile* mais inhibent tout de même la synthèse des toxines A/B. Ce phénomène d'interférence avec la pathogenèse de *C. difficile* semble dépendant de la présence et de la viabilité des lactobacilles. Il est donc possible de conclure que la production d'acides organiques n'est pas le seul mécanisme responsable de l'inhibition de la toxicité de la *C. difficile*.

MOTS CLÉS : *Clostridium difficile*, *Clostridioides difficile*, probiotiques, lactobacilles, infections, toxines, facteurs de virulence

2.2 Abstract

Clostridioides difficile infections (CDI) result from antibiotic use and cause severe diarrhea which is life threatening and costly. A specific probiotic containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 (Bio-K+) has demonstrated a strong inhibitory effect on the growth of several nosocomial *C. difficile* strains by production of antimicrobial metabolites during fermentation. Though many Lactobacilli can inhibit *C. difficile* growth through lactic acidification, this probiotic has demonstrated unique potency for CDI prevention among hospitalized patients; an effect replicated in multiple clinical trials. Here, we have investigated novel acid-independent mechanisms by which these strains impair *C. difficile* virulence. The hypervirulent strain *C. difficile* R20291 was co-cultured anaerobically with Bio-K+ probiotic strains in various media and glucose concentrations that inhibit or stimulate toxin production, for 24h at 37°C. At 5g/L glucose, no *C. difficile* toxin was produced and co-culture with these lactobacilli resulted in potent acidification and *C. difficile* growth inhibition. At 3g/L glucose, *C. difficile* toxin production occurred and acidification by the lactobacilli resulted in growth inhibition, $\geq 92\%$ reduced Toxin A and $\geq 51\%$ Toxin B production. In the absence of glucose and a starting pH of 7.0, TY broth, *C. difficile* produced the greatest amount of toxin. In co-culture, the lactobacilli did not acidify the medium and *C. difficile* growth was unaffected. The amount of Toxin A and B produced was decreased by 24% and 43% respectively. The supernatant of *C. difficile* cultured alone under these conditions was cytotoxic to human fibroblast cells, but when co-cultured with the Lactobacilli the cells exposed to the supernatant were able to survive. These results suggest that the combination of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 interferes with *C. difficile* pathogenesis through: 1) inhibition of *C. difficile* growth (via lactic acid secretion), 2) reduced toxin A/B quantity and 3) toxin neutralization. These results might explain the strain specificity of Bio-K+ probiotic bacteria in potently preventing *C. difficile* associated diarrhea in antibiotic treated patients compared to other probiotic formulae.

Keywords: *C. difficile*; *Clostridioides difficile*; *Lactobacillus*; probiotic; antibiotic; infection; pathogenesis, microbiota, colonization resistance; infection control, preventive intervention, Bio-K+

2.3 Introduction

In the United States, as well as in other industrialized countries, *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection (CDI) is an important cause of nosocomial diarrhea in hospitals and long-term care facilities, which adds to the patient's length of stay and may even lead to death (22% mortality within 90 days) [3]. The high morbidity, mortality and rate of recurrence highlight the need for strategies in primary prevention of the illness.

C. difficile is a strict anaerobe, spore-forming, Gram-positive bacillus found in the intestinal microbiota of 2 to 5% of healthy adults and in 10 to 20 % of the elderly (ASPC, 2014). CDI mostly develops when patients undergo antibiotic therapy and experience dramatically decreased diversity of species of normal intestinal microbiota. The alteration of the microbiota helps the bacteria to establish an infection that involves colonization of the enteric epithelium. When the vegetative cells reach the stationary phase and glucose is scarce, they begin to secrete toxin A and toxin B, resulting in intestinal inflammation and colonic epithelial cells necrosis. Toxin production is increased with quorum sensing as well as under low nutrient conditions, for example, when glucose is scarce (Dineen *et al.*, 2007).

Lactobacilli employ non-specific mechanisms, such as secretion of organic acids, bacteriocins or hydrogen peroxide, to compete with pathogens like *C. difficile* (Tejero-Sarinena *et al.*, 2012). Though often considered for the primary prevention of CDI, many lactobacilli-based probiotics have failed to demonstrate efficacy in preventing CDI indicating that not all probiotics are equal. A specific probiotic formulation (Bio-K+) has been evaluated in three randomized double blinded, placebo-controlled studies for the primary prevention of CDI (Beausoleil *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010; Sampalis *et al.*, 2010). In meta-analysis there were 80% fewer cases of CDI when treated with these live bacteria than with placebo (Goldenberg *et al.*, 2017; McFarland *et al.*, 2018b). A very large study of 2,981 subjects randomized to a mixture of 2 strains of *Lactobacillus* and 2 strains of *Bifidobacteria* failed to demonstrate a protective effect against CDI (Allen *et al.*, 2013). Only the microbial preparation comprised of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2, has reproducibly demonstrated equivalent potency for CDI prevention suggesting strain specific differences result in differential clinical effects (Goldstein *et al.*, 2015).

However, the mechanism by which the three lactobacilli prevents infection is not fully elucidated. Co-culture experiments demonstrated that these specific lactobacilli are able to inhibit the growth of several hospital-acquired *C. difficile* strains (Auclair *et al.*, 2015). It has

been also demonstrated that antimicrobial metabolites are synthesized and secreted during fermentation (Auclair *et al.*, 2015). Furthermore, *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 probiotic formulation have the capacity to, individually and collectively, protect epithelial cells *in vitro* by neutralizing the toxins (Auclair *et al.*, 2015). In each experiment, there was acidification of the medium; a possible explanation for the findings which is not specific to these Lactobacillus strains (Tejero-Sarinena *et al.*, 2012).

The objective of these studies was to quantify the antimicrobial and anti-virulence capacity of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 against *C. difficile* and to evaluate the role of acidification. Hence, in this study, the degree of *in situ* acidification by the lactobacilli is controlled by using media of differing glucose concentrations (Reinforced Clostridial Medium (RCM), Brain Heart Infusion (BHI) and Tryptose Yeast Extract (TY)), and determine if these probiotic strains are able to minimize *C. difficile* virulence without acidification.

2.4 Material and methods

2.4.1 Bacterial strains

C. difficile strain R20291 (BI/NAP1/027) was kindly provided by Professor Louis-Charles Fortier, Ph.D. (University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada). The strains were stored at -80°C in Reinforced Clostridial Medium (RCM) broth with 20% glycerol. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, and *L. rhamnosus* CLR2 were graciously provided by Bio-K Plus International Inc. (Laval, Canada). They were stored in De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) broth enriched with 20% glycerol at -80°C until utilization.

2.4.2 Growth kinetics

All growth kinetics were performed in an anaerobic chamber supplemented with a gas mix of 10% hydrogen, 5% carbon dioxide and 85% nitrogen (MEGS Specialty Gases and Equipment, Quebec, Canada). In all the following growth kinetics experiments, each lactobacilli strain were thawed and transferred in 9 mL of MRS broth and incubated at 37°C without oxygen. After 24h of incubation, 3 mL of the culture was split and sub-cultured into three tubes containing fresh 9 mL of MRS broth. This step was repeated three times in order to have triplicates. The cultures were incubated at 37°C for 24h. The same procedure was repeated with

the *C. difficile* strain. The bacterial content of *C. difficile* R20291 vial was thawed and cultured in 9 mL of pre-reduced RCM and incubated at 37°C for 24h. After two consecutive sub-cultures of all strains, bacteria were washed twice with Phosphate Buffer Saline (PBS) and centrifuged 10 min at 3700 x g (ThermoFisher Scientific Legend RT Plus, St-Laurent, Quebec). Thereafter, the bacteria were suspended in 15 mL of the medium used in each of the experiment, either RCM, modified Brain Heart Infusion(BHI) with 3g/L of glucose or Tryptose Yeast Extract (TY) (pH of 7.4). Even though the TY medium without adjustment was set to pH 7.4 initially, after adding bacteria the pH dropped. To run the assay at neutral pH, the solution was titrated to pH 7.0 with NaOH before starting the experiment. Optical density (OD) was then measured at 600nm, (Biomate Spectronic 3, ThermoScientific, Saint-Laurent, Quebec) Reader, Molecular Devices, San Jose, California) and the culture was standardized to 0.05 OD units for *C. difficile* and 0.5 OD units for the *Lactobacillus* sp. strains in a final volume of 30 mL. Several parameters were followed for 24h such as the bacterial count, pH, toxin quantification and cytotoxicity to Human Fibroblast Cells.

2.4.3 Microbial analysis

Samples of 2 mL were harvested at 0, 6, 12 and 24 h in order to evaluate the bacterial concentrations. Bacterial enumeration for *C. difficile* was carried out in a selective medium Cycloserine-Cefoxitin Fructose Agar (CCFA, Anaerobe System, CA, USA) under the same anaerobic conditions as described above. Lactobacilli were enumerated in MRS agar under aerobic atmosphere. Serial dilutions (in 1:10 dilution steps) were done by diluting the *C. difficile* monoculture and co-culture of *C. difficile* with the probiotic strains with reduced peptone water. A volume of 100 µL of the appropriate dilutions were plated. The CCFA plates were then incubated at 37°C for 24 - 48h, whereas, MRS plates were incubated 48h at 37°C. Bacteria confirmation steps and sterility controls and triplicates were executed in each experiment.

2.4.4 Quantification of toxins A/B

The quantification of toxins A/B was performed using a commercial ELISA method (tgcBIOMICS GmbH, Mainz, Germany). According to the manufacturer's instructions, samples were added in microtitre plate coated with antibodies specific to toxin A and B and incubated for 60 min at 37°C. Subsequent to three washes with the wash buffer, anti-toxin A and B were added and incubated at 37°C for 30 min. After three washing steps, the substrate was added in

each well and incubated at room temperature for 15 min. The color development was stopped with H₂SO₄. A standard curve was done with the inactivated pure toxin A and B samples provided by the manufacturer. The results were measured by a spectrophotometer (Vmax software, Molecular Devices, California, United States) at 450 and 650 nm. In all experiments, toxin A and B were quantified in supernatant from 24h co-culture of *C. difficile* with and without the probiotic strains. Percentage of toxin reduction was calculated using the following equation:

$$\% = \left(\frac{CD \text{ toxin A or B concentration } \left(\frac{ng}{mL} \right) - (CD + LB) \text{ toxin A or B concentration } \left(\frac{ng}{mL} \right)}{CD \text{ toxin A or B concentration } \left(\frac{ng}{mL} \right)} \right) \times 100$$

2.4.5 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity test was performed with The Bartels Cytotoxicity Assay (NovaCentury Scientific A Trinity Biotech Company, Burlington, Ontario) according to the manufacturer's instructions. Bartels Cytotoxicity Assay, containing Human Fibroblast Cells, was used due to its specificity to toxin B. The culture supernatants were centrifuged for 10 min at 3700 × g (ThermoFisher Scientific Legend RT Plus, Saint-Laurent, Quebec), filtered and added to the wells. As it is suggested by the manufacturer, 100 µL of the supernatant was diluted with 100 µL of the diluent. The cells were then incubated at 37°C. After 2 - 24h of incubation it was possible to differentiate impaired cells from normal cells using a microscope (EVOS XI Core Cell Imaging System, ThermoFisher Scientific, Saint-Laurent, Quebec) at a 20x magnification. The positive control was the addition of purified *C. difficile* toxin B to the cells resulting in a rounded, asteroid-like shape and a stringy cytoplasm (Auclair *et al.*, 2015). Cells were exposed to supernatant produced after 24h of *C. difficile* cultured alone or in co-culture with the three lactobacilli strains in TY medium.

2.4.6 Statistical analysis

All experiments were performed in three independent triplicates. For each replicate three samples were analyzed. Concentration of toxins A and B were compared between the

monoculture of *C. difficile* and the co-culture of *C. difficile* with the three lactobacilli. The one-way ANOVA was employed for the toxin A and B analysis. Therefore, a Welch's ANOVA was performed for toxin A analysis. P-values inferior or equal to 0.05 ($P \leq 0.05$) were considered as significantly different. The growth and pH were measured in each condition then compared by using ANOVA one-way where p-values inferior or equal to 0.05 ($P \leq 0.05$) were considered as significantly different.

2.5 Results

2.5.1 Inhibition of toxin synthesis in high glucose medium

First, toxin levels were quantified in a high-sugar medium where *C. difficile* was cultured alone or co-cultured with the Bio-K+ probiotic strains. RCM broth is a medium containing a high concentration of glucose (0.5% (w/vol.)) and formulated to promote the growth of *Clostridium* sp. As shown in Figure 2.1, RCM supported *C. difficile* R20291 growth. An average increase of 1.8 \log_{10} CFU/mL was observed followed by entry into stationary phase after 6 hours. However, when exposed to *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2, *C. difficile* R20291 growth was completely inhibited in triplicate experiments. This inhibition could be explained by medium acidification; an average pH difference of 1.02 log between the monoculture and the co-culture after 12 hours of incubation. At 24 hours, *C. difficile* was not detected. As expected, in the presence of a high concentration of glucose, toxins were not detected by ELISA in any of these experiments.

2.5.2 Toxin secretion inhibition in low glucose medium

The amount of glucose in solution was decreased in order to demonstrate that acidification affects toxin production. Modified BHI broth containing 3 g/L of glucose was used in this series of assays. The growth of *C. difficile* was quantified in co-culture and monoculture. In Figure 2.2, an average difference of 1.49 \log_{10} CFU/mL in *C. difficile* growth was observed after 6 h of co-culture with the probiotic strains. After 12 h of incubation, a drop of 2.51 \log_{10} CFU/mL was observed in the co-culture compare to the monoculture of *C. difficile*. A drop in pH of 0.75 log was also observed between the co-culture and monoculture of *C. difficile*. The use of a lower

quantity of glucose level allowed the detection of toxins as compared to RCM media where toxins were not detected. The concentration of toxin A and B in co-culture of *C. difficile* and probiotic strains after 24h of incubation at 37 °C was reduced by $\geq 92 \pm 4\%$ and $\geq 51 \pm 11\%$ respectively (Figure 2.4A). Toxins A and B concentration were lower than the limit of quantification of the ELISA kit (≤ 1.25 ng/mL) in each of the triplicate experiments in the co-culture. In monoculture of *C. difficile*, there was not as much Toxin B produced relative to Toxin A, which may be related to the presence of glucose in the growth medium.

2.5.3 Toxin secretion inhibition in glucose-depleted medium

Other mechanisms of action specific to Bio-K + strains are suspected to be involved. Hence, *C. difficile* was co-cultivated with the Bio-K+ probiotic strains in TY medium. TY medium was selected because it has no glucose, it permits the growth of lactobacilli with minimal acidification and *C. difficile* can thrive and secrete toxins A and B. As shown in Figure 2.3, *C. difficile* growth increased by $1.04 \log_{10}$ CFU/mL on average after 24h. In the co-culture with the three lactobacilli, the growth of *C. difficile* also increased, by an average of $0.76 \log_{10}$ CFU/mL. After 24h, of uninhibited growth *C. difficile*, toxin A and B concentrations were 127 ± 11 ng/mL and 202 ± 46 ng/mL respectively in monoculture, and were 96 ± 16 ng/mL and 114 ± 32 ng/mL in co-culture. Thus, in the presence of the Bio-K+ strains there was a statistically significant reduction of toxin A and toxin B production, $24 \pm 8\%$; $p=0.001$ and $43 \pm 5\%$; $p=0.001$ respectively (Figure 2.4B). In this experiment, pH value was set to 7, throughout the experiment medium acidified significantly to 6.3 ± 0.0 ; $p=0.000$ in monoculture of *C. difficile* and 6.6 ± 0.2 ; $p=0.01$, in the co-culture of *C. difficile* with lactobacilli. pH of *C. difficile* monoculture ended up with a lower pH than the co-culture.

2.5.4 Cytotoxicity assay

Human Fibroblast Cells are highly sensitive to intact *C. difficile* toxin B. Even a decreased amount of toxin B production should lead to potent cytotoxicity to the cells. as observed under an inverted microscope. Cells were exposed to the monoculture and co-culture supernatant for 4h; Table 2.A represents healthy cells. As shown in Table 2.B, the supernatant of *C. difficile* monoculture, harvested after 24h, drastically affected the morphology of the cells. Human Fibroblast Cells became rounded up and appeared refractile. In contrast, cells exposed to the

supernatant from the co-culture of *C. difficile* with the three lactobacilli cultivated in TY, cells had only started to detach and adopt a stringy shape, Table 2.C, but remained viable.

2.6 Discussion

Primary prevention of *C. difficile*-associated diarrhea (CDAD) is achieved by targeting a variety of stages of this pathogenic anaerobe's life cycle. Here we focused on the stationary phase of the bacterium and observed that these probiotic bacteria inhibited growth, reduced toxin production and minimized the cytotoxicity of toxin. By controlling the experimental conditions, we were able to demonstrate that each of these mechanisms of action is amplified at lower pH. Tejero-Sarinena *et al.* (Tejero-Sarinena *et al.*, 2012) investigated fifteen selected probiotic strains against a wide range of pathogens including *C. difficile* and have shown by agar well-diffusion assay that the main inhibitory mechanism employed by probiotics is synthesis of organic acids resulting from the fermentation of glucose which lowers the pH in the culture and kills *C. difficile*. When *C. difficile* and Bio-K+ strains are co-cultivated with a high amount of glucose (5g/L, RCM, Figure 2.1), the growth of lactobacilli results in lactic acidification and a bactericidal effect on *C. difficile* occurs within 12 to 24 hours. But, it was not possible to determine if lactobacilli had an effect on toxin production, since *C. difficile* do not produce any toxins under these conditions. The presence of glucose inhibits the CodY global transcriptional regulator in *C. difficile* which represses toxin genes located on the pathogenicity locus (Martin-Verstraete *et al.*, 2016).

The anti-*C. difficile* activity of Bio-K+ strains observed in previous *in vitro* experiments may be associated to a non-specific mechanism available to many lactobacilli; the secretion of lactic acid, a major end-product of glucose fermentation (Tejero-Sarinena *et al.*, 2012). However, very few lactobacillus-based probiotics have demonstrated an ability to reduce CDI in hospitalized patients. Therefore, lactic acidification is unlikely to be the only anti-*C. difficile* mechanism of action. In one series of experiments, a lower glucose concentration, 3 g/L, was employed to create conditions where toxin production and lactic acidification by lactobacilli could both occur. Thus we were able to quantify toxin A and B production while *C. difficile* growth is also inhibited. These co-culture conditions resulted in potent *C. difficile* growth inhibition, an average of 3.8 log₁₀ CFU/mL decrease, which confirms again that acidification inhibits *C. difficile* growth (Figure 2.2). At the same time, Toxin A production was reduced by at least 92% and B by 51%

(Figure 2.4A). This demonstrates that these 3 lactobacilli employ at least two complimentary mechanisms for reducing *C. difficile* virulence, inhibition of growth and toxin production.

To minimize the influence of lactic acidification, the experiments were repeated in a glucose-depleted medium, TY. When cultivated in a medium at neutral pH, *C. difficile* survived in the presence of Bio-K+ probiotic strains. Interestingly, a significant reduction in toxin synthesis of 24% and 43% (Figure 2.4B) for toxin A and B respectively was observed even though *C. difficile* growth was uninhibited (Figure 2.3). Thus, toxin production by *C. difficile* is sensitive to pH, but even at neutral pH the presence of these lactobacilli appeared to impair production.

Toxin quantification by ELISA is only an estimate of the activated and inactivated toxins present in the culture. Hence, a cytotoxicity test was done in order to see if the toxins measured were active. The qualitative cytotoxicity of each sample was assayed with human fibroblast cells which are highly sensitive to even one picogram of Toxin B as per the manufacturer. The cells exposed to the supernatant of *C. difficile* grown alone and without glucose, about 23.2 ng of Toxin B, expectedly rounded cells within 4 hours (Table 2.C). Though *C. difficile* Toxin B production was diminished in the presence of the probiotic cultures there was still 3-4 orders of magnitude sufficient amount of Toxin B to round the cells in this assay. Exposed to approximately 13.2 ng Toxin B from the co-culture of *C. difficile* with lactobacilli in TY broth, the cells appeared morphologically different from controls after 4 hours, but were still viable (Table 2.B). Thus, the lactobacilli are able to neutralize Toxin B in a manner that protects living cells and was partially effective at neutral pH.

Many lactic acid producing bacteria decrease *C. difficile* viability and virulence, and, most of these lose their effect when the pH is neutralized (Naaber *et al.*, 2004). Recently it was shown that certain strains of lactic acid producing bacteria have pH independent mechanisms of action against *C. difficile* (Fredua-Agyeman *et al.*, 2017; Najarian *et al.*, 2018) related to bacteriocins or bacteriocins like compounds (Cheikhyoussef *et al.*, 2008; Fredua-Agyeman *et al.*, 2017). *L. acidophilus* La-5 showed reduced cytotoxicity and cytopathic effects of *C. difficile* on HT-29 and CaCo-2 cells, excluding lactic acidification (Najarian *et al.*, 2018). In our study, we demonstrated that the presence of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, and *L. rhamnosus* CLR2 reduces toxin A and B production by *C. difficile* without lactic acidification and without

inhibiting its growth. The dual mechanisms of diminished production of toxin, plus, neutralization of the remaining toxin effectively protected Human Fibroblasts Cells from cytotoxicity. Several questions remain about how these probiotic bacteria modulate toxin A and B production, which could be investigated by looking more closely at the impact on *C. difficile* gene expression or other pathways. Nevertheless, the observation that Bio-K+ strains interfere with *C. difficile* pathogenesis through multiple complimentary mechanisms, helps explain why these strains have demonstrated potency for primary *C. difficile*-associated diarrhea prevention when many others probiotics have not.

2.6.1 Funding

This research was funded by the Natural Science Engineering Research Council of Canada (NSERC), grant number “CRDPJ 505365-16” and Bio-K+ International Inc.

2.6.2 Acknowledgments

We would like to thank Martin Gélinas, Maya Gros, Myriam Coutu and Valerie Robichaud for their technical support.

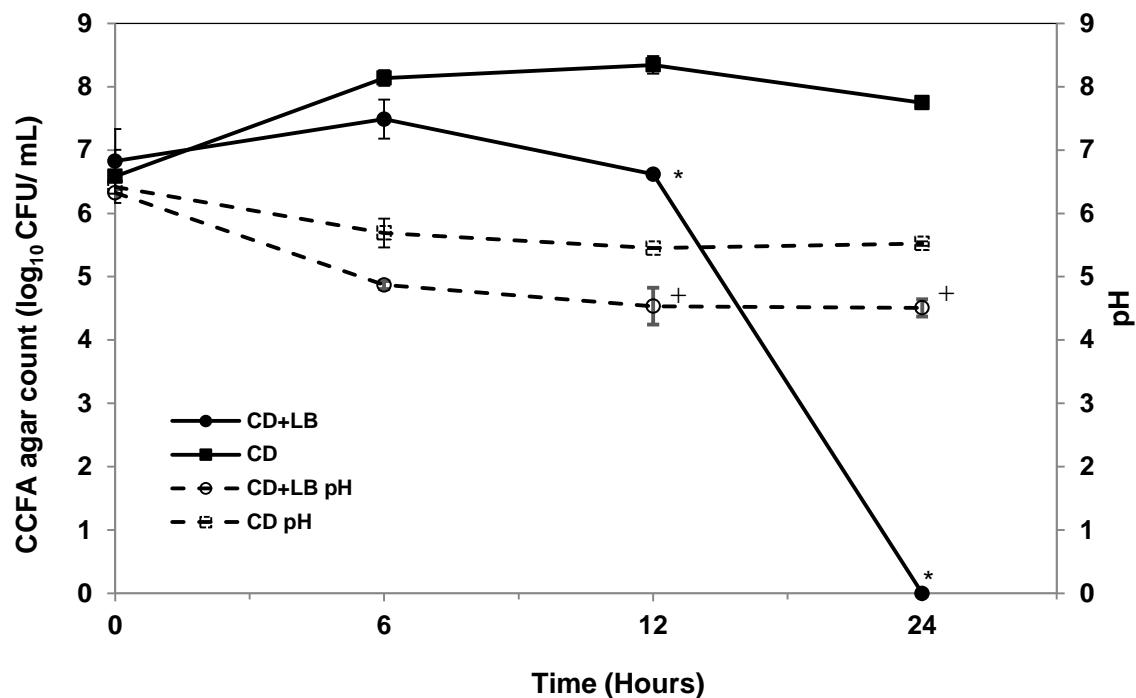


Figure 2.1 *In vitro* model of *Clostridioides difficile* R20291 growth kinetics when cultured alone or in the presence of *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 in medium containing glucose (RCM broth) leading to acidification of the medium. (■) Growth of *C. difficile* monoculture; (□) pH of *C. difficile* monoculture; (●) Growth of *C. difficile* after co-culture of *C. difficile* with the three lactobacilli (LB); (○) pH of the co-culture of *C. difficile* with the three lactobacilli. Growth of *C. difficile* was measured by plate count on Cycloserine-Cefoxitin Fructose Agar (CCFA) under anaerobic conditions after 48h at 37°C. This experiment was carried out in triplicate.*indicates that the growth values of the co-culture of *C. difficile* with lactobacilli are significantly different from the monoculture of *C. difficile*. + indicates that the pH values of the co-culture of *C. difficile* with lactobacilli are significantly different from the monoculture of *C. difficile*.

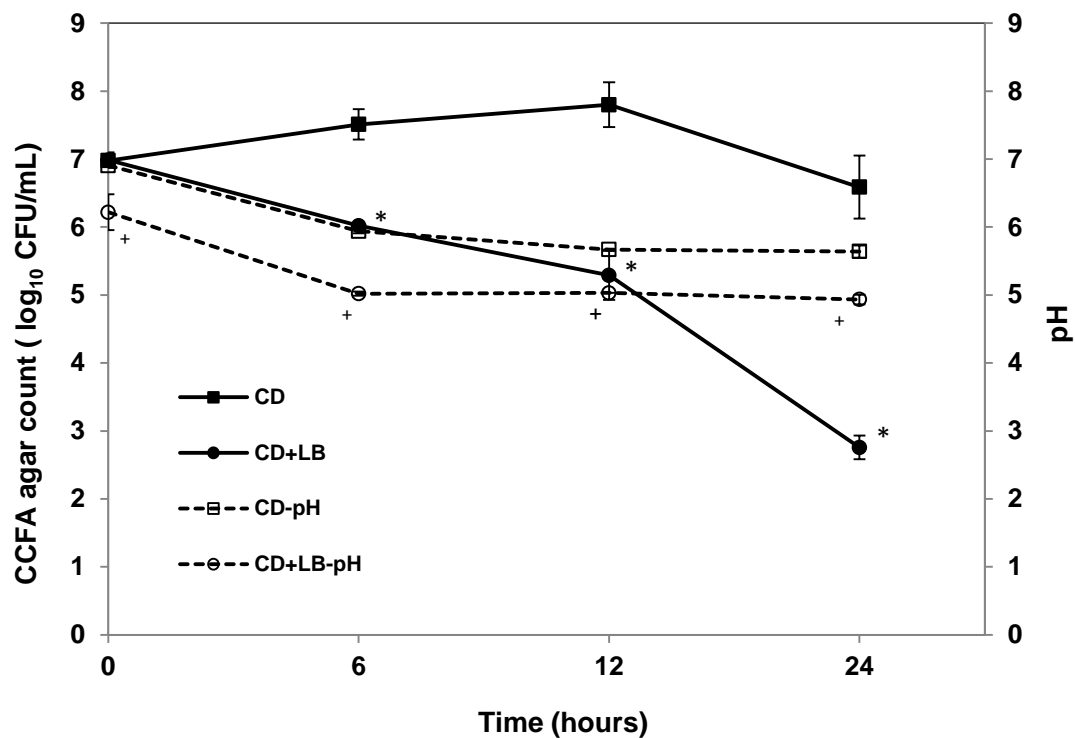


Figure 2.2

In vitro model of *Clostridioides difficile* R20291 growth kinetics in co-culture with or without *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 in medium with low glucose (BHI broth) limiting acid production in the medium. (■) Growth of *C. difficile* monoculture; (□) pH of *C. difficile* monoculture; (●) Growth of *C. difficile* after co-culture of *C. difficile* with the three lactobacilli; (○) pH of the culture *C. difficile* with the three lactobacilli. Growth of *C. difficile* was measured by plate count on CCFA agar under anaerobic conditions after 48h at 37°C. This experiment was carried out in triplicate. *indicates that the values are significantly different from the monoculture of *C. difficile*. + indicates that the pH values are significantly different from the monoculture of *C. difficile*.

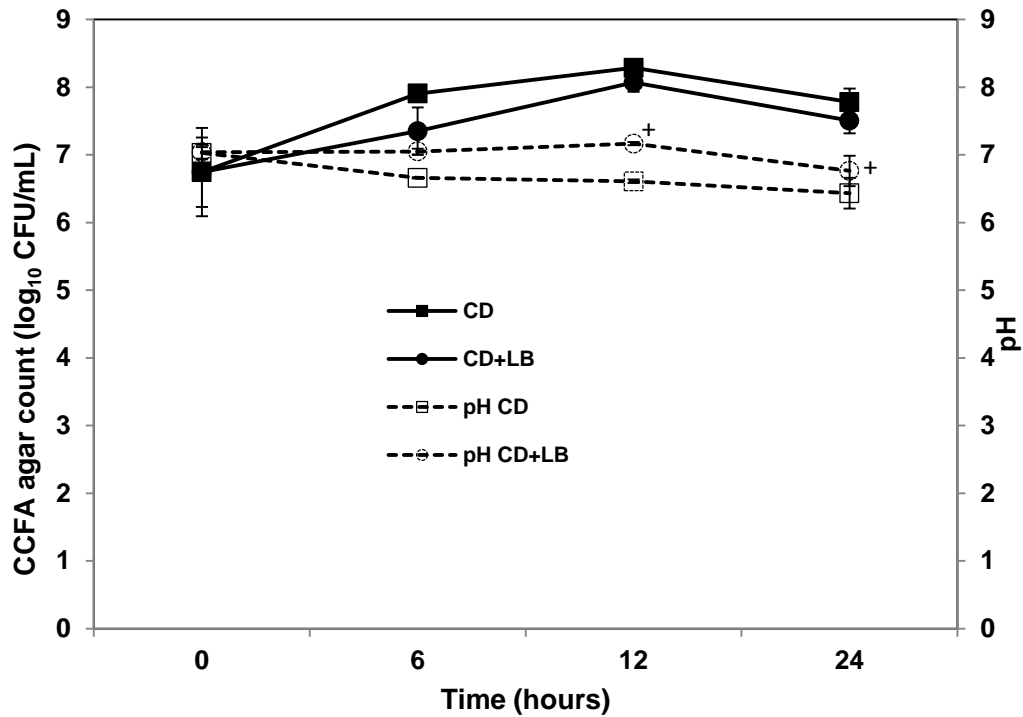


Figure 2.3

In vitro model of *Clostridioides difficile* R20291 growth kinetics in co-culture with or without *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 in medium without glucose (TY broth) limiting acid production in the medium. (■) Growth of *C. difficile* monoculture; (□) pH of *C. difficile* monoculture; (●) Growth of *C. difficile* after co-culture of *C. difficile* with the three lactobacilli; (○) pH of the culture *C. difficile* with the three lactobacilli. Growth of *C. difficile* was measured by plate count on CCFA agar under anaerobic conditions after 48h at 37°C. This experiment was carried out in triplicate. *indicates that the values are significantly different from the monoculture of *C. difficile*. + indicates that the pH values are significantly different from the monoculture of *C. difficile*.

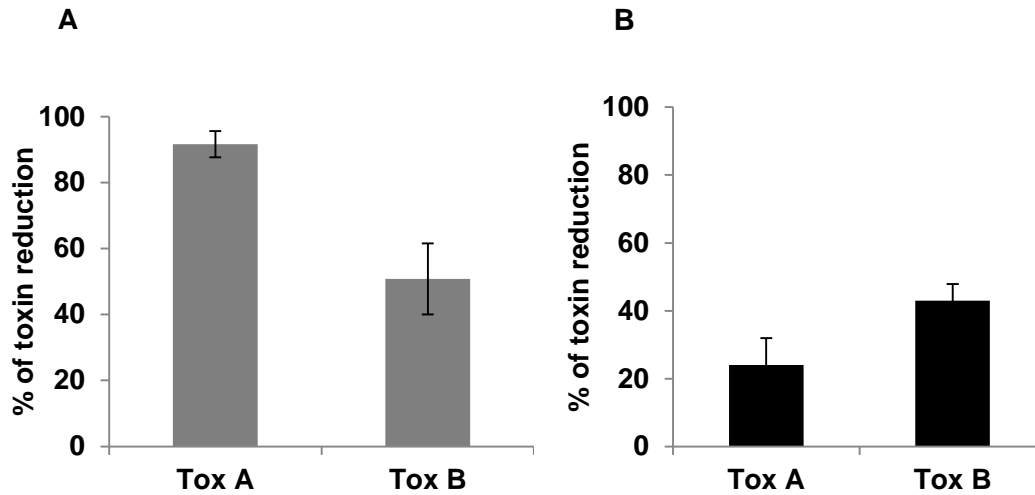

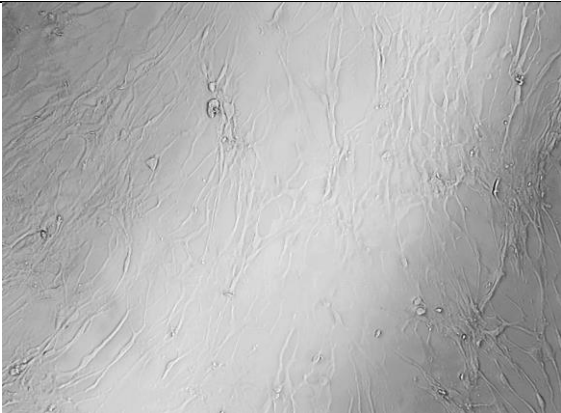
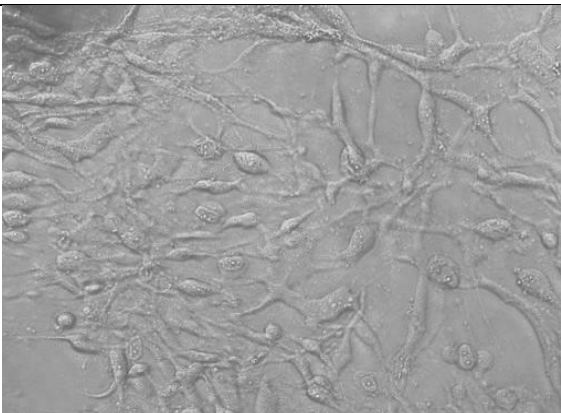


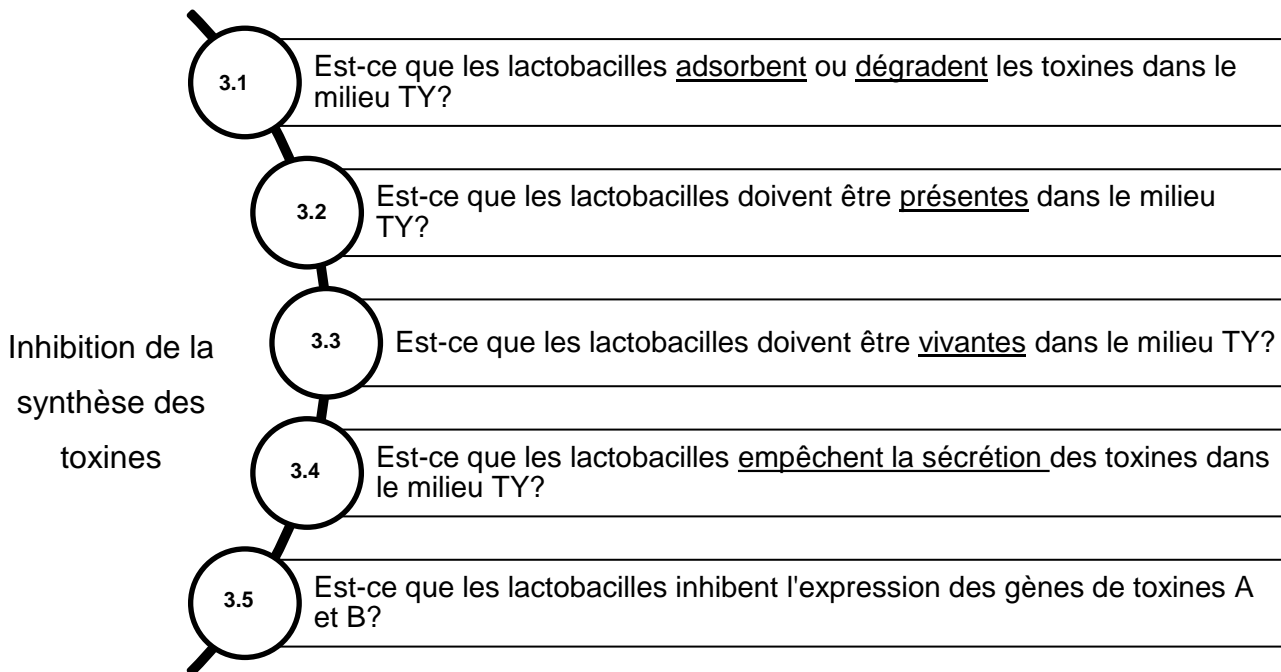
Figure 2.4 % of Toxin A and B reduction after 24hrs in an *In vitro* model of *Clostridioides difficile* R20291 co-cultured with or without *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2. Cultures were cultivated in an acidifying medium with low concentration of glucose and in a non acidifying medium without glucose (BHI & TY broth). Figure 2.4.A represents % of toxin A and B decrease in co-culture of *C. difficile* in BHI broth (■). Figure 2.4.B represents % of toxin A and B decrease in co-culture of *C. difficile* in TY broth (■). This experiment was carried out in triplicate. In all conditions below the concentration of toxin A and B in the co-culture was significantly different from the monoculture of *C.difficile*

Table 2.0 Cytotoxicity Assay of Cell-Free Supernatant from 24 h of co-culture with or without *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 in TY medium on Human Fibroblasts. After adding the supernatant results were taken after 4h of incubation at 37°C with CO₂

Experiment	Bartel's Cytotoxicity Assay microscopy	pH	Score
A) Healthy Human Fibroblast Cells		6.9	1.Cells are morphologically healthy
B) Exposed to supernatant of <i>C. difficile</i> co-cultured with the Lactobacilli		6.6	2.Cells are morphologically different but healthy
C) Exposed to supernatant of <i>C. difficile</i> culture alone		6.3	3.Cells are dead, rounded and detached

3 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Le modèle de co-culture en tubes dans du TY, tel que décrit dans la section 2, a permis d'évaluer l'impact des souches Bio-K+ sur le taux d'expression des toxines de *C. difficile*. Tel que démontré dans le chapitre précédent, une réduction de 24% de toxine A et de 43% de toxine B dans la co-culture avec les souches Bio-K+ par rapport à la culture pure de *C. difficile* a été observée. À la lumière de ces résultats, plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'expliquer cette diminution de toxines observée dans la co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques. Voici un diagramme qui représente les nouvelles questions de recherche qui ont été soulevées :



3.1 Méthode

3.1.1 Conditions de culture

Toutes les expériences réalisées et expliquées dans ce chapitre ont été réalisées dans une chambre anaérobie maintenue à 37°C (Whitley DG250, DonWhitley Scientific) et contenant 10% CO₂, 10% H₂ et 80% N₂. Les milieux de culture, le tampon phosphate, l'eau peptonée

utilisés dans les expériences sont conservés en anaérobie 24h avant chaque expérience afin d'enlever toute trace d'oxygène. Le dénombrement des bactéries lactiques a été fait en aérobie sous la hotte laminaire.

3.1.1.1 Entreposage et préparation des bactéries

Avant chaque expérience, un tube de *C. difficile* R20291, contenant 1mL de *C. difficile* ($\cong 7$ logUFC/mL) dans du bouillon de culture RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) et 20% de glycérol et conservé à -80°C , a été vidé dans une éprouvette contenant 9 mL de bouillon RCM pré-réduit stérile et a été incubé pendant 24h à une température de 37°C . Après les 24 h, 1 mL de culture de *C. difficile* a été transféré à nouveau dans 9 mL de bouillon de culture RCM pour que la transition entre -80°C et $+37^{\circ}\text{C}$ soit mieux tolérée par les bactéries et que les expériences soient réalisées avec des bactéries moins stressées. De même, les tubes des trois souches probiotiques ont été conservés à -80°C dans du bouillon de culture MRS (de Man Rogosa et Sharpe) additionné de 20% de glycérol. Chaque tube a été vidé dans 9 mL de bouillon MRS pré-réduit stérile et a été incubé 24 h à 37°C . Après 24 h, 1mL de culture de chaque lactobacille a été transféré à nouveau dans 9 mL de bouillon de culture MRS. Après les deux repiquages successifs, les bactéries ont été centrifugées pendant 10 minutes à $3700 \times g$ puis subissent deux lavages successifs dans 20 mL de tampon phosphate 1X (PBS). Après les lavages au PBS, les souches ont été chacune suspendues dans 15 mL de TY et la densité optique a été par la suite mesurée à la longueur d'onde de 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Biomate Spectronic 10, ThermoScientific). Pour constituer la co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques, les trois souches ont été combinées, à partir d'une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 chacune et de 0,05 pour *C. difficile*. Selon le volume final employé dans l'expérience, les co-cultures ont été complétées avec du TY.

3.1.1.2 Quantification des bactéries sur gélose et mesure du pH

Après 24h, le dénombrement de *C. difficile* ont été fait sur des géloses Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar (CCFA). Pour ce faire, la culture a été diluée en série et un volume de 100 μL des dilutions a été étalé sur les géloses CCFA à l'aide de billes de verre stériles. Les géloses ont été incubées à 37°C anaérobie pendant 24 h. Le dénombrement des lactobacilles a été fait, tel que décrit précédemment, sur des géloses MRS et incubées à 37°C en aérobie pendant 48 h.

Le pH des co-cultures et monocultures a été mesuré grâce à un pH mètre (Thermo Scientific, Orion Star LogR).

3.1.1.3 Quantification des toxines A et B

La quantification de la concentration de toxines A et B a été réalisée en suivant les recommandations du fabricant du kit ELISA (Separate detection of *C. difficile* toxins A and B, tgcBIOMICS). Afin de pouvoir doser la concentration de toxines, des échantillons 1 mL de la culture pure et de la co-culture sont prélevés et centrifugés à 3700 x g pendant 10 minutes. Les échantillons sont par la suite conservés à 4°C jusqu'à l'analyse (1 semaine maximum).

3.1.2 Effet des souches probiotiques sur les protéines de toxines de *C. difficile*

Un tube de *C. difficile* R20291 a été ensemencé dans RCM après deux repiquages consécutifs, la culture a été lavée avec PBS et ajustée à une DO de 0,05 dans du TY. Après 24h d'incubation à 37°C, la culture a été centrifugée et filtrée. Le surnageant a été cultivée en présence d'une culture des trois lactobacilles (DO de chacune ajusté à 0.5) (voir Figure 3.1). Le test de T-Student a été utilisé afin de voir s'il y a une différence significative entre la quantité de toxines au début et à la fin de l'expérience après l'ajout des souches probiotiques.

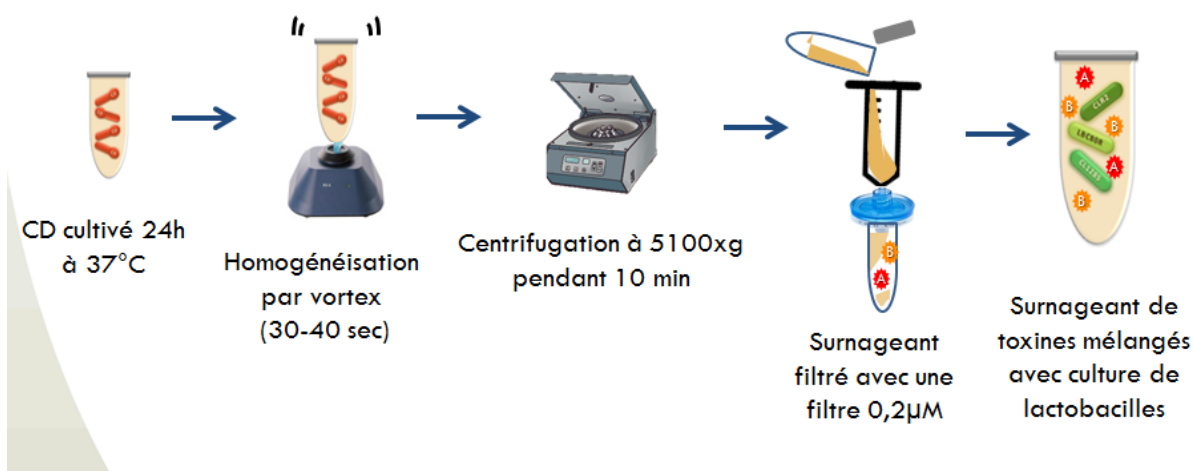


Figure 3.1 Schéma représentant les étapes à suivre afin de préparer le surnageant de toxines de *C. difficile*

3.1.3 Préfermentation du milieu de culture par les souches probiotiques et impact sur le taux d'expression des toxines de *C. difficile*

Après les étapes de lavages et de resuspension dans TY, trois cultures ont été constituées soit une monoculture de *C. difficile* à une DO de 0,05, une co-culture des trois souches probiotiques à une DO de 0,5 chacune et une troisième co-culture qui contient les trois souches probiotiques à un DO de 0,5 chacune et *C. difficile* à un DO de 0,05. Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24h en anaérobie. Les cultures ont été filtrées, puis leur pH a été ajusté à 6,7 avec du NaOH 1M. Le surnageant a été à nouveau filtré avec un filtre 0,2 µM et mélangé avec du TY frais à 25, 50 et 100% (vol/vol). Par la suite, *C. difficile* a été inoculé dans chacune des cultures (25, 50 et 100% (vol/vol) de milieu préfermenté) à une DO de 0,05. Après 24h d'incubation à 37°C en anaérobie, le dénombrement de *C. difficile*, le pH et la mesure du taux de toxines présentes dans le milieu ont été mesurés.

3.1.4 Importance de la viabilité des souches probiotiques dans leur capacité à réduire le taux d'expression des toxines de *C. difficile*

Les trois souches Bio-K+ ont été cultivées dans du bouillon MRS, puis lavées 2 fois au PBS et suspendues dans du TY afin d'obtenir une culture des trois lactobacilles ayant chacun une DO de 0,5. Deux cultures ont été préparées ainsi en triplicata. Une des deux a été bouillie pendant 10 minutes. La seconde a été traitée par irradiation gamma (source de cobalt 60) à une dose de 9kGy (taux de dose :10,976 kGy/h) en utilisant un irradiateur de type Underwater Calibrator UC15-A (Nordion Inc, Laval,Qc,Canada) (Baldwin *et al.*, 2010). Une fois les bactéries tuées, les milieux ont été ramenés à un pH de 6.9 avec du NaOH 2M, puisensemencés avec *C. difficile* (DO= 0,05). Après 24h d'incubation en anaérobie, *C. difficile* a été dénombré sur gélose CCFA. Le taux d'expression des toxines a été mesuré pour chacune d'elles après 24h d'incubation à 37°C et comparé à celui d'une culture pure de *C. difficile* dans du TY. Des mesures de pH et des dénombrements bactériens ont également été effectués dans les trois cultures.

3.1.5 Séquestration intracellulaire des toxines de *C. difficile* lorsque *C. difficile* est exposé aux souches probiotiques

Dans ces expériences, *C. difficile* en culture seul et en co-culture avec les lactobacilles dans le TY ont été lysés avec une méthode combinant l'utilisation de lysozyme et de billes de verre. Le protocole qui a été employé provient de Jonquière *et al* (1999) qui comprend de la mutanolysine

(60µg/mL), la RNAaseA (250 µg/mL), l'AEBSF (2 mM) ainsi que des cycles de gel/dégel. Cependant le volume de solution de lyse employé a été modifié à 500 uL et le culot de cellule qui a été obtenu suite aux lavages a été resuspendu dans un volume de 6 mL de TY. Au T0 et T24, après les lavages et après la lyse, des échantillons ont été recueillis afin de pouvoir effectuer des dénombrements bactériens et la quantification des toxines.

3.1.6 Optimisation de l'extraction de l'ARN de *C. difficile*

Plusieurs techniques d'extraction ont été testées afin d'optimiser l'extraction d'ARN de *C. difficile*. En premier lieu, l'extraction de l'ARN de *C. difficile* a été faite avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) en combinant le RNase-Free Dnase Set (Qiagen) et le RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen). La méthode qui combine l'extraction enzymatique et mécanique proposé par Qiagen, a été testée avec des échantillons de culture de *C. difficile* seul et de *C. difficile* en co-culture avec les souches probiotiques après 24h, d'après le protocole recommandé par le manufacturier. Par la suite, des échantillons à 6h et à 18h de la cinétique de la souche R20291 en milieu TY ont été testés. Cependant, afin d'obtenir un meilleur rendement de l'ARN extrait, les quantités initiales de bactéries conseillées pour l'extraction ont été augmentées jusqu'à 4 mL ($\cong 7 \log_{10}$ UFC/mL) pour *C. difficile*. Il y a aussi eu l'ajout de mutanolysine à la concentration de 150 U/mL et le temps de broyage mécanique a été changé de 5 minutes recommandées à 1 heure. Ces modifications ont été appliquées en adaptant le protocole proposé par Zhang, 2012 (Zhang, 2012). De plus, pour s'assurer d'avoir un échantillon d'ARN qui ne contient aucune trace d'ADN, un traitement supplémentaire à la DNase a été réalisé en utilisant le TURBO DNA-free Kit (Ambion). Après extraction, les échantillons (~1000 ng) ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant contenant 1 % d'agarose et eau de javel avec 4 % hypochlorite de sodium suspendus dans du TBE 1X et sont visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Cette méthode de visualisation d'ARN a été adaptée de Aranda et al., 2012 (Aranda *et al.*, 2012). Les échantillons ainsi extraits ont été envoyés à Génome Québec afin que l'analyse transcriptomique soit réalisée. Une autre méthode d'extraction avec du TRIzol a été appliquée afin de pouvoir extraire à 24h en suivant le protocole qui a été fourni par le Professeur Louis Charles Fortier de l'Université de Sherbrooke. Des échantillons de 4mL de culture de *C. difficile* ont été prélevés après 6 heures et 24 heures de culture. Ces échantillons ont été centrifugés 10 minutes à 3700xg. Les culots ont été resuspendus dans 1 mL TRIzol dans des tubes vissés puis broyés grâce à des billes de verre. Une fois centrifugés, le

surnageant de ces échantillons a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf puis 200 uL de chloroforme a été ajouté. Après centrifugation, la phase aqueuse provenant du surnageant a été prélevée et une deuxième extraction au TRIzol/ chloroforme a été complétée. L'ARN a été précipité avec 500 uL de l'isopropanol et incubé 10 minutes à température pièce puis lavé à l'éthanol (1mL) avant d'être resuspendu dans de l'eau sans Rnase. L'ARN ainsi extrait a été purifié par un traitement avec le Rnase-out (Invitrogen) et le TURBO DNase (Invitrogen) d'après les conseils du manufacturier afin d'éliminer les enzymes potentiellement présentes ainsi que l'ADN qui aurait été extrait en même temps que l'ARN. Les échantillons d'ARN ont été migrés sur gel dénaturant et visualisés par coloration au bromure d'éthidium et exposition UV.

Afin de pouvoir mesurer l'expression des gènes *tcdA* et *tcdB* codant pour les toxines A et B respectivement, des amorces ciblant ces gènes ont été conçus. En parallèle, afin de pouvoir mesurer l'expression de gènes de référence, des amorces ciblant les gènes codant pour les l'ARNr 16S, la glutamate déshydrogénase 1 (*gluD*), gyrase sous-unité A (*gyrA*), triose phosphate isomérase (*tpiA*), DNA-directed RNA polymerase subunit alpha ont été testées : *tcdA*, *tcdB*, 16S_LCF et *rpoA* (voir Tableau 3.0). Toutes ces amorces ont été testées afin de déterminer leurs températures d'hybridation optimales et évaluer leur efficacité à cette température. Les conditions employées pour les réactions de PCR temps réel sont illustrées dans le Tableau 3.1. Des essais ont également été menés afin de s'assurer que ces amorces ne peuvent se lier spécifiquement avec l'ADNc des lactobacilles. L'ARN des lactobacilles a été extrait avec le kit de Qiagen en suivant les recommandations du manufacturier.

Gène ciblé	Nom	Séquence	Compagnie
16S	CD16S_LCF2014.F	ACG GTA CTT GAG GAG GAA GCC C	Alpha DNA
	CD16S_LCF2014.R	TGA GCC GTA GCC TTT CAC TCC T	Alpha DNA
gluD	CDgluD_LCF2014.F	GTT GAC GTT CCT GCA CCA GAC G	Alpha DNA
	CDgluD_LCF2014.R	ACC ACC AAA TTC AAC TGG CTT ACC A	Alpha DNA
tcdA	CDtcdA_SS.F	AGC TTT CGC TTT AGG CAG TGT TAT AAA TCA AGC	Alpha DNA
	CDtcdA_SS.R	TAT CAG ACT CTA TGG CTG GGT TAA GGT G	Alpha DNA
tcdB	CDtcdB_SS.F	AGC ATA TGC GGC AGC TTA TCA AGA	Alpha DNA
	CDtcdB_SS.R	GCA TCG TCA AAT GAC CAT AAG CTA GC CAT T	Alpha DNA
tpiA	CDtpiA_LCF2014.F	TGC ATA TGA GCC AAT CTG GGC TAT TG	Alpha DNA
	CDtpiA_LCF2014.R	TGA AGG TTT AAC ACT TCC ACC GTA TTG T	Alpha DNA
gyrA	CDgyrA_LCF2014.F	ACA GAA ATA AGA CAT GCT GAA GGC GA	Alpha DNA
	CDgyrA_LCF2014.R	GTG CTG AAA TAC CTC TTC CAC CCC	Alpha DNA

<i>rpoA</i>	CDrpoA_LCF2014.F	TCA TTA CCA GGT GTA GCA GTG AAT GC	Alpha DNA
	CDrpoA_LCF2014.R	TGA TAG AGC ATG GTC CTT GAG CTT CT	Alpha DNA

Tableau 3.0 Amorces ciblant les gènes de référence ou gènes de virulence de *C. difficile* utilisé dans les essais d'expression utilisé dans les études d'expression de gène

Tableau 3.1 Les conditions des réactions PCR temps réel CFX-96 employées

	Nombre de cycles	Température	Temps
Pré-incubation	1 cycle	95 ⁰ C	10:00 min
Amplification	40 cycles	95 ⁰ C	0:15 min
Gradient		65 ⁰ C***	0:30 min
		68 ⁰ C	0:30 min
Courbe de Tm	1 cycle	95 ⁰ C	0:15 min
		65 ⁰ C	0:15 min
		95 ⁰ C	0:15 min
Refroidissement	1 cycle	20 ⁰ C	2:00 min

**Température varie selon les amorces

3.2 Résultats

Les résultats énumérés dans ce chapitre sont des résultats préliminaires qui doivent être validés par des répétitions supplémentaires.

3.2.1 Effet des souches probiotiques sur les protéines de toxines de *C. difficile*

Une des hypothèses formulée serait que les lactobacilles adsorbent ou dégradent les protéines de toxines (Castagliuolo *et al.*, 1999). D'après les résultats obtenus, la différence observée entre la quantité de toxines mesurée au début (Tox A 236 ng/mL et Tox B 269 ng/mL) et la fin

de l'expérience (Tox A 175 ng/mL et Tox B 222.89) n'est pas significative avec un $p= 0,08$ (voir Tableau 3.2). Ces résultats démontrent que les lactobacilles n'adsorbent pas ou ne dégradent pas les toxines dans le milieu TY.

Tableau 3.2 Quantification des protéines de toxines A et B de *C. difficile* après 24h d'exposition aux souches probiotiques dans le milieu TY

Temps	Tox A (ng/mL)	Tox B (ng/mL)
0	235.6±0.4	268.6±0.8
24	175.3 ±1.3	221.03±1.71

3.2.2 Préfermentation du milieu de culture par les souches probiotiques et impact sur le taux d'expression des toxines de *C. difficile*

Afin de déterminer si la réduction du taux d'expression des toxines de *C. difficile* observée lors des co-cultures avec les souches probiotiques peut être due à leurs activités métaboliques, du milieu TY a été préfermenté durant 24h par les trois souches probiotiques puis stérilisé par filtration. Puisque l'activité des souches probiotiques contre l'expression des toxines de *C. difficile* peut être induites en réponse à la présence de la bactérie et non de façon constitutive, du milieu TY a également été préfermenté durant 24h par *C. difficile* et les trois lactobacilles et par la suite stérilisé. *C. difficile* a été ensemencé dans différents concentrations soit 25, 50 et 100% de ces cultures de TY préfermentés. L'expérience a été conduite trois fois et les résultats démontrent que la présence de milieux préfermentés, à n'importe quel pourcentage, augmente la production de toxines A et B chez *C. difficile* comparativement au contrôle (voir Figure 3.2). De plus, le dénombrement et la mesure du pH ont été réalisés. Les résultats démontrent dans tous les cas soit 25, 50 et 100% de TY préfermenté par les souches probiotiques, il y a une légère croissance de plus de 0,5 log₁₀ UFC/mL (Voir Figure 3.2).

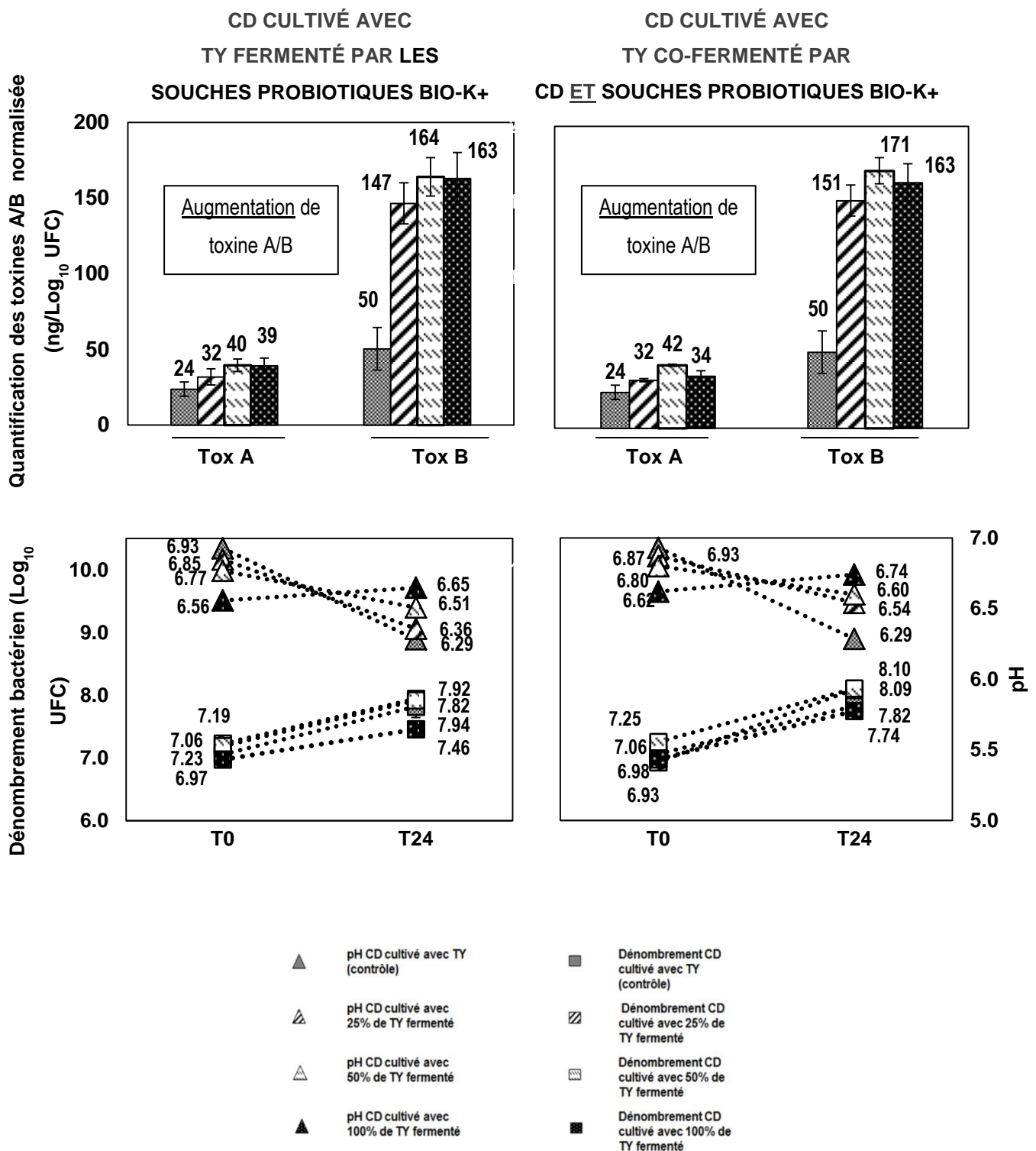


Figure 3.2

Taux d'expression des toxines lorsque CD R20291 est cultivé dans différentes concentrations de TY préfermenté par les souches Bio-K+ ou par une combinaison de ces souches avec CD R20291 dans un modèle de co-culture anaérobie en tubes à 37°C durant 24h. Le taux d'expression des toxines (A) a été mesuré à l'aide d'un essai de détection immunoenzymatique quantitatif (« ELISA for separate detection of *C. difficile* Toxin A or B in suspension® »). Des mesures de pH et des dénombrements bactériens ont également été réalisés.

3.2.3 Importance de la viabilité des souches probiotiques dans leur capacité à réduire le taux d'expression des toxines de *C. difficile*

Pour déterminer si les souches Bio-K+ doivent être vivantes pour causer une réduction du taux d'expression de toxines A et B et pour savoir si cet effet dépend d'une entité moléculaire liée à ces bactéries, deux cultures de souches probiotiques dans du TY ont été stérilisées; l'une par irradiation gamma et l'autre par un traitement thermique. La stérilisation par irradiation gamma à faible dose préserve l'intégrité structurelle des bactéries mortes et conserve les protéines sous leur forme native. Il n'y a donc pas de différences « physiques » entre une culture vivante et une culture faiblement irradiée car seule l'ADN des bactéries est dégradé. Inversement, la stérilisation par traitement thermique lyse les bactéries et dénature la plupart de ses composantes.

Le contact de *C. difficile* avec les souches traitées par irradiation augmente la production de toxine A de $142.0 \pm 9.6\%$ et toxine B de $115.9 \pm 4.4\%$. L'exposition aux souches détruites par la chaleur augmente la production de toxine A de $289.2 \pm 23.4\%$ et toxine B de $172.3 \pm 4.8\%$ (voir Figure 3.3). Les valeurs de pH et de dénombrement sont restées stables comme cela était attendu pour des cultures dans du TY. La conclusion générale qui pourrait être soutenue est que l'inhibition de la synthèse toxine observée peut seulement être observée lorsque les souches probiotiques sont vivantes.

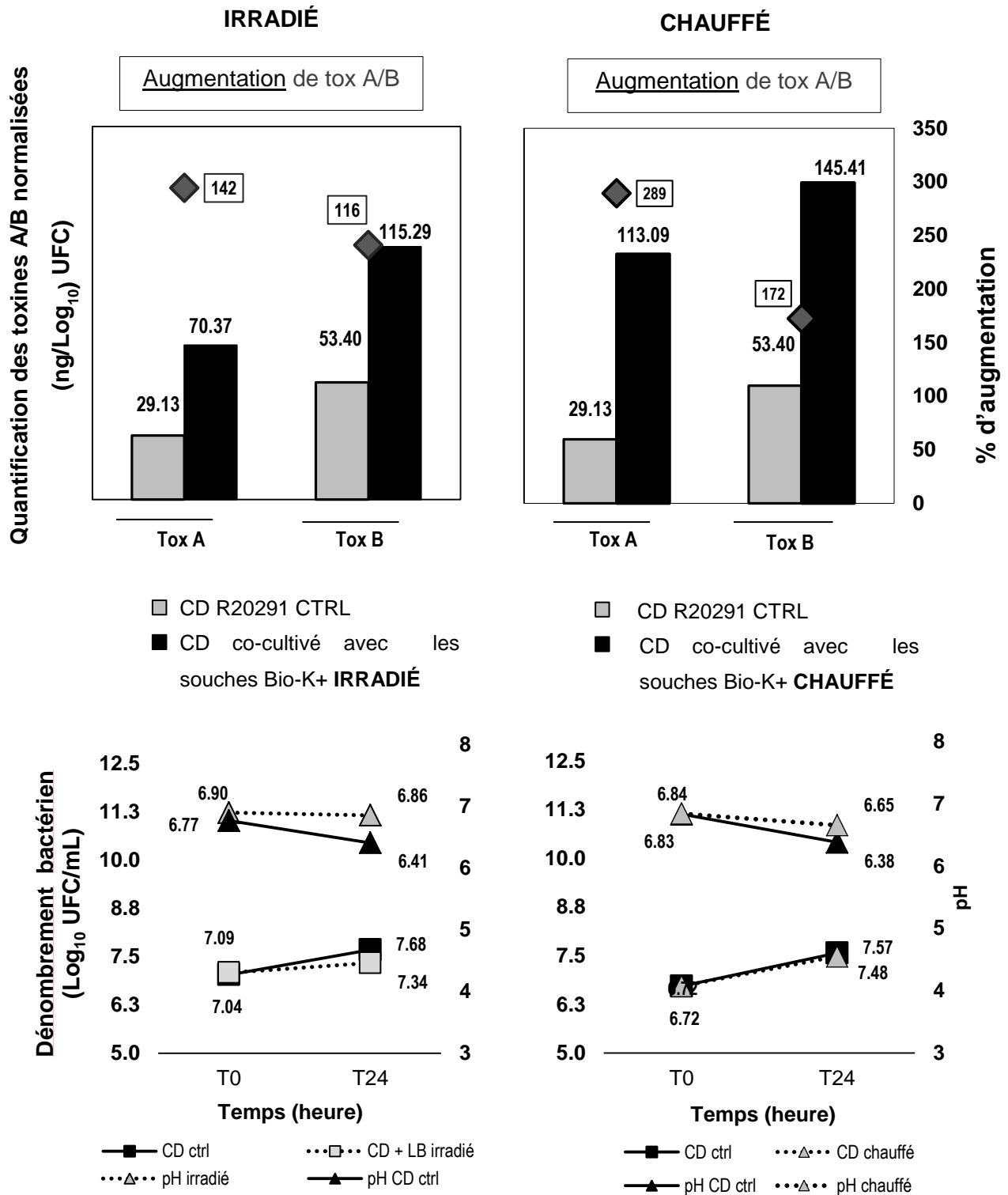


Figure 3.3

Croissance de CD R20291 dans une (i) co-culture dans du TY avec les souches Bio-K vivantes, dans (ii) une culture de souches Bio-K+ stérilisée par une exposition aux rayons gamma de 9 kGy avec un dose rate de 10,679 kGy/h (Irradiated) et dans (iii) une culture de souches Bio-K+ chauffée durant 10 min à 100°C. Les trois cultures ont été incubées en condition anaérobie à 37°C durant 24 h. Le taux d'expression des toxines (A) a été mesuré à l'aide d'un essai de détection immunoenzymatique quantitatif (« *ELISA for separate detection of C. difficile Toxin A or B in suspension*® »). Des mesures de pH et des dénombrement bactérien ont également été réalisés (B).

Séquestration intracellulaire des toxines de *C. difficile* lorsque *C. difficile* est exposé aux souches probiotiques

Des expériences ont été réalisées afin de déterminer si la réduction des toxines présentes dans le milieu lors d'une co-culture dans le TY de *C. difficile* avec les souches probiotiques pouvait être causée par une séquestration des toxines. Les résultats d'une première série d'expérience ont suggéré que la quantité de toxines A et B mesurée à l'intérieur de *C. difficile* dans la co-culture était nulle. En effet, il y a libération de toxines suite à la lyse de la monoculture de *C. difficile* alors que suite à la lyse de *C. difficile* avec les lactobacilles ce n'est pas le cas. Ces nouveaux résultats laissent croire que le *C. difficile* ne produit pas de toxines lors d'un contact avec les lactobacilles ainsi celles-ci ne restent pas emprisonnées à l'intérieur comme ce qui avait été émis comme hypothèse. Afin de valider les résultats, l'expérience devra être répétée.

3.2.4 Optimisation de l'extraction de l'ARN de *C. difficile*

L'extraction d'ARN de *C. difficile* a été faite avec le kit de Qiagen. Deux protocoles principaux ont été présentés dans le manuel du manufacturier. Le premier, comportant seulement une extraction enzymatique, et le second une extraction enzymatique et mécanique. Chaque méthode a été testée à trois reprises (n=3) et comparées afin de déterminer laquelle présente une plus grande quantité et une meilleure qualité d'ARN. La seconde méthode permet l'extraction d'une plus grande quantité d'acides nucléiques, cependant la qualité d'ARN total extrait se révèle être très similaire dans les deux cas. La méthode a par la suite été optimisée en augmentant la quantité de cellules au départ, en haussant les temps de centrifugation, afin d'obtenir une meilleure quantité d'ARN finale. Les ratios 260/230 des échantillons d'ARN extraits ont été acceptable cependant la visualisation sur gel d'agarose était difficile. Les échantillons ont été envoyés à Génome Québec pour des analyses de qualité. Malheureusement, les échantillons n'ont pas passé le test de contrôle qualité. D'après les résultats obtenus, l'ARN était dégradé et une contamination par des solvants a été notée. Par la suite, des modifications ont été apportées au protocole en suivant les recommandations de Zhang *et al* (2012) (Zhang, 2012) qui a eu les mêmes difficultés. L'ajout de mutanolysine, l'augmentation de la quantité de culture prélevée et le temps de broyage ont été modifiés dans le protocole. De plus, les échantillons ont été prélevés après 6 et 18h d'incubation au lieu de 24h. La visualisation des bandes 16S et 23S de l'ARN a été possible par la mise en place du

gel dénaturant (1% d'eau de Javel) tel que recommandé par Aranda *et al* (2012) (voir Figure 3.4) (Aranda *et al.*, 2012)

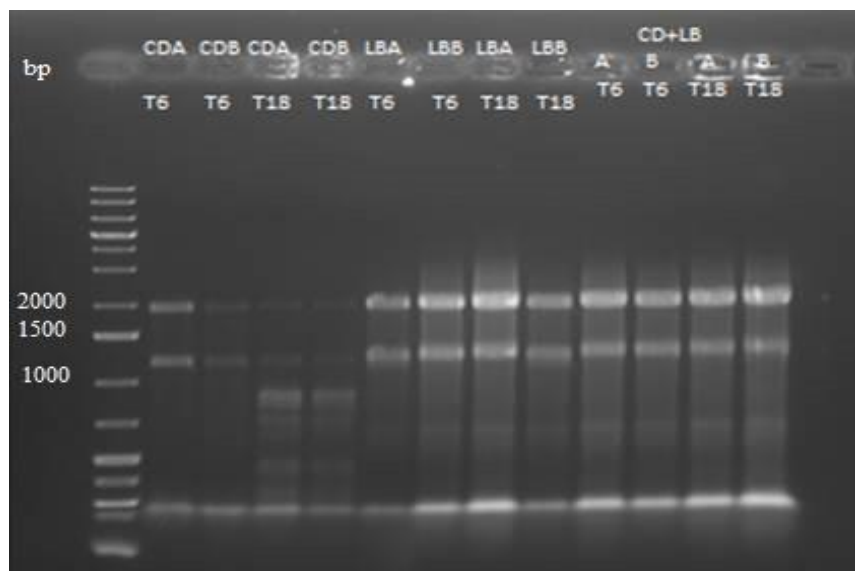


Figure 3.4 Visualisation, après migration par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant, de l'extraction d'ARN provenant des échantillons recueillis d'une culture de *C. difficile* seul (CD), *C. difficile* + souches probiotiques Bio-K+ (CD+LB) et souches probiotiques Bio-K+ seules (LB) après 6 et 18 heures et en duplicata. L'extraction a été faite avec le kit Qiagen. .

Les différents profils de migration comportent 2 bandes supérieures correspondant à l'ARN 23S et au 16S. (Figure 3.4). L'ARN de *C. difficile* qui a été extrait à 6h ne présente pas le même profil de migration que l'ARN extrait à 18h. À 18h, en plus des bandes d'ARN 23S et 16S, il y a la présence d'autres bandes de tailles inférieures qui pourraient correspondre à de la dégradation de l'ARN (Figure 3.4). Les bandes qui présentent l'échantillon d'ARN de *C. difficile* seul présentent de faibles bandes de migration tandis que l'ARN extrait des *Lactobacillus* sp. seuls et l'ARN de *C. difficile* en co-culture avec les souches probiotiques présentent des bandes avec une bonne intensité. Ainsi, lors du contrôle de la qualité des échantillons par Génome Québec, l'ARN à 18h n'a pas passé le test de contrôle qualité. Le RIN (*RNA Integrity Number*) qui quantifie la qualité de l'ARN était à N/A . Tandis que pour les échantillons de 6h, le RIN était à 8.8, ce qui correspond à un ARN de bonne qualité. Cependant dans le cas de 18h, l'ARN est dégradé. Ainsi, il fallait poursuivre les protocoles d'extraction de l'ARN puisque le but principal du projet était de mesurer le niveau d'expression des gènes de toxines A et B après 24h. Une des techniques les plus utilisées pour extraire l'ARN est l'extraction au Trizol. La technique a été testée avec une culture de *C. difficile* de 24h. Cependant, l'ARN était toujours dégradé. Par

contre, à 6h, l'ARN a pu être extrait mais, il était possible d'observer la présence d'autres bandes (Voir Figure 3.5).



Figure 3.5 Visualisation après migration par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant, de l'extraction d'ARN provenant des échantillons recueillis d'une culture de *C. difficile* seul (CD) après 6 et 18 heures et en duplicata.

Parallèlement, les amorces des gènes de toxines et les gènes de référence ont été développés. Les essais d'expression génique ont été faits avec 5 gènes de références : *16S_LCF*, *gluD*, *gyrA*, *tpiA* et *rpoA*. Seules les amorces *16S_LCF* amplifient l'ADNc des lactobacilles. Elles ont donc été exclues pour les essais d'expression de gènes à partir de l'ARN extrait d'une co-culture de *C. difficile* et de lactobacilles. L'ensemble des amorces (excepté *gluD* et *rpoA*) ont obtenues des valeurs d'efficacité supérieures à 90% à trois reprises (n=3) et sont valides pour des expériences d'expression génique. Parmi tous les gènes de références mentionnés précédemment, les couples d'amorce *gluD* et *rpoA* ne présentait pas une valeur d'efficacité figurant dans le cadre recommandé pour des expériences d'expression génique (90-110%). Tous les autres couples listés présentaient des valeurs convenables. Les essais vont également être effectués avec les deux gènes d'intérêts *tcdA* et *tcdB*. Les deux ont également été testés pour leur efficacité, la spécificité et la température d'hybridation optimale à trois reprises (n=3) car ce sont les gènes connaissant potentiellement une variation dans leur taux d'expression lorsqu'en présence de lactobacilles.

Tableau 4. Bilan d'efficacité et de la spécificité des amorces

Gène ciblé	Séquence	Tm théorique (Oligoanalyzer)	Tm empirique	E moyen (%)	Spécificité	Spectre d'efficacité (Cq)
16S rRNA	ACG GTA CTT GAG GAG GAA GCC C	60.8	65.0	93±4	NON	9,47- 27,93
	TGA GCC GTA GCC TTT CAC TCC T	60.2				
gluD	GTT GAC GTT CCT GCA CCA GAC G	60.6	65.0	86.7±1	OUI	13,22- 33,37
	ACC ACC AAA TTC AAC TGG CTT ACC A	59.1				
	AGC TTT CGC TTT AGG CAG TGT TAT AAA TCA AGC	60.6				
tcdA	TAT CAG ACT CTA TGG CTG GGT TAA GGT G	59.2	65.0	90±3	OUI	13,15- 31,03
	AGC ATA TGC GGC AGC TTA TCA AGA	58.8				
tcdB	GCA TCG TCA AAT GAC CAT AAG CTA GC CAT T	60.7	65.0	91±2	OUI	11,68- 30,32
	TGC ATA TGA GCC AAT CTG GGC TAT TG	59.1				
tpiA	TGA AAG TTT AAC ACT TCC ACC GTA TTG T	58.3	65.0	99±8	OUI	12,27- 29,83
	ACA GAA ATA AGA CAT GCT GAA GGC GA	58.5				
gyrA	GTG CTG AAA TAC CTC TTC CAC CCC	54.2	65.0	93±6	OUI	12,48- 35,12
	TCA TTA CCA GGT GTA GCA GTG AAT GC	58.9				
rpoA	TGA TAG AGC ATG GTC CTT GAG CTT CT	59.4	61.0	88±5	Non- détermi- né	14,40- 37,22

4 DISCUSSION

L'objectif général de ce projet consistait à développer les connaissances scientifiques sur les mécanismes d'action anti-*C. difficile* par lesquels la combinaison de *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 exercent une action préventive contre les DACD. Selon l'hypothèse de départ, la présence des souches probiotiques inhiberait la croissance de *C. difficile*, neutraliserait ses toxines et inhiberait la synthèse des toxines via une réduction de l'expression des gènes de toxines. Le premier objectif spécifique était de démontrer que la production de l'acide lactique par les probiotiques inhiberait la croissance de *C. difficile*. Ainsi, les bactéries ont été cultivées dans un bouillon riche en glucose, le RCM. Lorsque *C. difficile* et les souches probiotiques sont co-cultivés ensemble dans le RCM, la croissance des lactobacilles se déroule normalement, mais l'acidification lactique produit un effet bactéricide contre *C. difficile* entre 12h et 24h. Cependant, la quantification de toxines n'a pas pu être complétée dû à la présence de glucose. En effet, en général, lorsque le glucose est en quantité suffisante dans le milieu, le régulateur *CodY* va réprimer les gènes situés sur le locus de pathogénicité de *C. difficile* (Martin-Verstraete *et al.*, 2016). Ainsi, la quantification des protéines de toxines n'a pas pu être complétée car la synthèse aurait été inhibée soit par l'acidification soit par la trop grande concentration de glucose dans le milieu. Afin de démontrer l'inhibition de la sécrétion de toxines par *C. difficile*, lors d'une acidification, une expérience a été faite dans un milieu BHI où la concentration de glucose a été modifiée à 3g/L. Cette concentration de glucose a été déterminée, après différents essais, comme étant la concentration optimale permettant à la fois une quantification des toxines et une acidification du milieu. Dans cette expérience, il a été possible de démontrer que la présence des lactobacilles dans un milieu avec glucose, inhibe les concentrations de toxines A et B de $\geq 92 \pm 4\%$ et $\geq 51 \pm 11\%$ respectivement. La croissance de *C. difficile* décroît de 3.83 log UFC/mL en présence des probiotiques après 24h. Cette activité anti-*C. difficile* des souches probiotiques Bio-K+ est un mécanisme d'action dit « non spécifique », car la sécrétion d'acide lactique est commune à toutes les espèces du genre *Lactobacillus* (Tejero-Sarinena *et al.*, 2012). Or, très peu de probiotiques appartenant au genre *Lactobacillus* n'a démontré une quelconque capacité à réduire les DACD chez les patients hospitalisés. Ainsi, l'acidification lactique ne peut pas être le seul mécanisme d'action par lequel les trois souches probiotiques exercent une action préventive contre les DACD, ce qui laisse croire qu'il y a d'autres mécanismes d'action spécifiques à ces souches probiotiques. Le troisième objectif du projet était de trouver un modèle qui permettrait d'exclure l'impact causé par l'acide lactique. Ainsi, le modèle de co-

culture en tubes dans le TY a été mis en place. Le TY est connu pour favoriser la croissance et la production de toxines chez *C. difficile* (Dupuy & Sonenshein, 1998). La synthèse des toxines chez *C. difficile* dépend de plusieurs facteurs dont la concentration des nutriments et en particulier celle du glucose. Un milieu pauvre en sucres et en glucose comme le TY, activera le gène *CodY* et permettre ainsi la production de toxines A et B chez *C. difficile*. Le modèle TY a permis d'évaluer l'impact des souches probiotiques sur la croissance et la concentration de toxines de *C. difficile* sans que l'acidification soit un facteur.

Lorsque le pH est très peu influencé par la culture de lactobacilles comme c'est le cas dans le TY, le *C. difficile* co-cultivé avec les lactobacilles produit 24% moins de toxine A et 43% moins de toxine B par rapport à la monoculture de *C. difficile*. Les pourcentages de réduction observés démontrent que la combinaison des trois souches de lactobacilles a un effet sur la synthèse des toxines sans que ce soit provoqué par une acidification. À la lumière de ces résultats, plusieurs hypothèses ont été formulés afin d'expliquer la réduction de toxines A et B.

La première hypothèse était que les souches probiotiques dégraderaient les protéines de toxines A et B par l'entremise de la sécrétion d'une certaine molécule. Il a été démontré que le *Saccharomyces boulardii* sécrète une serine protéase qui dégrade les toxines A et B de *C. difficile* (Castagliuolo *et al.*, 1999). Une autre étude a démontré que les probiotiques pourraient inhibés la liaison et l'internalisation des neurotoxines de *Clostridium botulinum* par un mécanisme autre que la dégradation ou la séquestration des neurotoxines (Lam *et al.*, 2016). Ainsi, une expérience a été conduite avec le surnageant de toxines A et B filtré qui a été incubé avec les trois souches probiotiques. Les résultats démontrent qu'il n'y a aucune différence significative entre la quantité de toxines au début de l'incubation versus la fin de l'incubation avec les souches probiotiques, ce qui signifie que les toxines ne sont pas dégradées ou adsorbées sur les lactobacilles. Deuxièmement, il a été supposé que la réduction observée pourrait être due à une activité métabolique des souches probiotiques lorsque ensemencées dans le TY. La préfermentation du milieu TY par les souches probiotiques ou par *C. difficile* combiné avec les souches probiotiques a été faite. Après 24h d'incubation, *C. difficile* a été inoculé dans du milieu TY contenant soit 25, 50 ou 100% de milieu préfermenté filtré et le taux d'expression des toxines a par la suite été mesuré. Même si la croissance de *C. difficile* est similaire dans toutes les conditions, celles comportant 50% et 100% de TY préfermenté ne se sont pas acidifiées. Une alcalinisation du milieu a même été mesurée. Par ailleurs, il est possible d'observer une nette augmentation de l'expression de toxines dans les cultures contenant du TY préfermenté, autant par les souches probiotiques qu'en combinaison avec

C. difficile, peu importe la proportion ajoutée. Ceci pourrait être expliqué par le manque de nutriments dans le milieu. En effet, le CodY et CCPA sont activés lorsqu'il y a un manque de nutriments ce qui inhibe *tcdR* et active la production de toxines A et B. Ainsi la présence des souches probiotiques semblent être importante pour affecter la production de toxines chez *C. difficile*. Le TY préfermenté ne semble pas contenir de métabolites susceptibles de jouer un rôle dans l'inhibition de la production des toxines observée lors des co-cultures. L'importance de la viabilité des bactéries lactiques a été questionnée en troisième lieu (Lahtinen, 2012). Il y a de plus en plus d'études qui démontrent que les probiotiques n'ont pas besoin d'être viables afin d'exercer leur effet bénéfique pour la santé. Certaines études ont démontrés que les lactobacilles viables ou non peuvent adhérer la muqueuse intestinale de façon équivalente (Lahtinen, 2012). Cependant l'adhésion peut dépendre de la manière que les bactéries ont été tuées; une étude a suggéré que le traitement par chaleur et par protéase nuisaient la capacité des probiotiques d'adhérer au mucus intestinal (Tuomola *et al.*, 2000). Des études ont également démontré que les bactéries irradiées pourraient activer le système immunitaire ce qui favorise l'hôte de se protéger (Gill & Rutherford, 2001; Kotani *et al.*, 2010). Pour ce faire, deux méthodes ont été testés soit l'irradiation gamma et le chauffage. En effet, l'irradiation a été employée afin de tuer les bactéries probiotiques sans affecter leur paroi bactérienne tandis que le chauffage a été employé pour lyser les bactéries (Lindberg *et al.*, 2014). Les résultats préliminaires obtenus démontrent que la présence de bactéries probiotiques mortes que ce soit irradiées ou lysées, induit une augmentation de la production de toxines A et B. Cette augmentation de la production de toxine peut être expliqué le fait que *C. difficile* soit exposé à un environnement en présence de molécules étrangères (relâché par les souches probiotiques lysées). Le stress engendré pourrait peut-être activer les gènes reliés à la production de toxines. Cependant, l'effet exercé sur le système immunitaire n'a pas été évalué dans notre modèle.

Quatrièmement, l'hypothèse était que la réduction de la quantité de toxine observée dans la co-culture après 24h serait due à la séquestration des protéines de toxine à l'intérieur de *C. difficile* par les souches probiotiques par un quelconque mécanisme d'action. D'après les résultats obtenus, aucune protéine de toxines ne semble être séquestrée à l'intérieur de la bactérie lorsque le *C. difficile* est cultivé avec les probiotiques. Ainsi, d'après les résultats préliminaires obtenus jusqu'à présent, il est possible de conclure que les souches probiotiques spécifiques doivent être vivantes et présentes en même temps que *C. difficile* afin de produire leur effet. Il semblerait également que la réduction de toxines ne soit pas causée par une séquestration à l'intérieur de la bactérie mais cela reste à être confirmé. Les résultats jusqu'à maintenant

obtenus démontrent que la réduction de la production de toxines observée semble être causée par une altération au niveau de l'expression des gènes de toxines A et B. Ainsi, l'optimisation de l'extraction de l'ARN a été initiée durant mon projet de maîtrise. Cependant aucun protocole évalué ne semble permettre une extraction satisfaisante de l'ARN de *C. difficile* après 24 h de culture. En effet, après 18 h de culture, le profil électrophorétique de l'ARN indique une dégradation de l'ARN. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'à 18h, la bactérie a atteint sa phase stationnaire (voir Figure 9 dans annexe I). Plusieurs groupes de recherche semblent avoir les mêmes problèmes tels que Zhang *et al* (2012) (Zhang, 2012). Cependant, d'autres groupes ont réussi à extraire l'ARN des spores de *C. difficile* ce qui nous laisse croire qu'il serait possible d'extraire l'ARN à la phase stationnaire (Dembek *et al.*, 2013). Ainsi, il faudrait optimiser la méthode d'extraction d'ARN de la phase stationnaire afin que l'analyse comparative des gènes puissent être réalisée entre une période où la production de toxine n'est pas quantifiée (T6) et une période où la production de toxine est quantifiée et importante (T18) et cela autant dans une monoculture de *C. difficile* que dans une co-culture avec les souches probiotiques.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours des dernières années, Bio-K Plus a réalisé trois études randomisées en double aveugle et contre placebo qui ont démontré que les produits probiotiques Bio-K+ possèdent une très forte capacité à réduire l'incidence des DACD chez les patients hospitalisés. Ce projet a donc eu pour objectif de déterminer par quel(s) mécanisme(s) les souches Bio-K+ exercent une action préventive contre les DACD en excluant le facteur d'acidification. À partir d'un modèle de co-culture anaérobie dans du TY des souches Bio-K+ et de *C. difficile*, il a été possible d'observer une réduction de plus de 24% et 43% des toxines A et B respectivement lorsque la bactérie pathogène est exposée aux souches probiotiques (Figure 2.4). Des expériences complémentaires suggèrent que les souches Bio-K+ doivent être vivantes (Fig 3.3) et présentes dans l'environnement de *C. difficile* (Fig 3.2) pour produire cet effet anti-toxine. Il semblerait également que la réduction de toxines ne soit pas causée par une séquestration à l'intérieur de la bactérie, mais cela reste à être confirmé. Toutes ces résultats portent à croire que les trois lactobacilles réussissent à inhiber la synthèse des gènes de toxines A et B de *C. difficile*. Ainsi, l'optimisation de l'extraction de l'ARN a été débutée et elle est toujours en cours. En effet, il faudrait trouver un moyen afin d'extraire l'ARN de *C. difficile* entre 12 et 24h afin de voir si l'effet observé est due à une inhibition des gènes de toxines A et B. Par la suite, une analyse transcriptomique est prévue dans le but de pouvoir vérifier tous les gènes qui sont transcrit ou inhibé.

Plusieurs hypothèses ont été évaluées dans ce projet. Cependant, il reste plusieurs autres pistes qui pourraient être investiguées telles que les nutriments présents ou transformés dans l'environnement, l'analyse des gènes *CodY* et *CcpA* qui pourraient avoir un effet indirect sur la synthèse des toxines. Dernièrement, un groupe de scientifiques ont démontrés que la production de toxines chez *C. difficile* pourrait être régulée par le *quorum sensing*. Le *quorum sensing* (QS) est une communication inter bactérienne qui dépend de la population bactérienne et repose sur la synthèse et la diffusion de petites molécules appelées auto-inducteurs. Lorsque la concentration en auto-inducteurs atteint un seuil, ceci permet d'activer un complexe qui régule l'expression des gènes. Par analyse comparative de génomes, Stabler *et al* (2009) (Stabler *et al.*, 2009) ont mis en évidence la présence chez *C. difficile* 027 d'un locus similaire à l'opéron *Agr* conservé chez les bactéries à Gram positif, dont *S. aureus*. Martin *et al* (2013) (Martin *et al.*, 2013) ont démontré que le locus *Agr* de *C. difficile* contrôle la synthèse de ses flagelles et l'expression des gènes qui sont impliqués dans le métabolisme des riborégulateurs

diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP). Récemment, Darkoh *et al* 2015 (Darkoh *et al.*, 2015) ont montré que la synthèse de toxines par *C. difficile* est régulée par un gène accessoire *Agr* qui agirait sur le système de QS de *C. difficile*, lui-même médié par la sécrétion de l'auto-inducteur thiolactone, nommée signal TI « *toxin-inducing signal* ».

Plusieurs auteurs ont démontré que certaines souches de lactobacilles peuvent interférer dans le système de QS. Valdez *et al* (2005) (Valdez *et al.*, 2005) ont mis en évidence la capacité d'une souche de *Lactobacillus plantarum* à inhiber la production d'acyl-homoserine-lactone, molécule signal du QS, ainsi que la production de facteurs de virulence contrôlés par cette même molécule chez *P. aeruginosa*. Il a aussi été démontré que la souche *Lactobacillus reuteri* RC-14 produit des petites molécules de signalisation capables d'interférer avec le système de QS de *S. aureus*, ce qui réprime l'expression du gène TSST-1 codant pour la toxine du syndrome du choc toxique. De plus, il a été démontré que la souche *Lactobacillus acidophilus* GP1B a un effet inhibiteur non seulement sur la croissance de *C. difficile* mais aussi sur l'expression de ses gènes de virulence en diminuant la production d'AI-2, molécule signal du système de QS associé aux gènes *lux* de *C. difficile* (Yun *et al.*, 2014). Ainsi, toutes ces évidences laissent présager que la combinaison *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 pourrait agir en interférant avec la communication de *C. difficile*. Un article a été rédigé afin de recenser les informations connues sur l'inhibition du QS de divers pathogènes par les probiotiques (voir Chapitre 6). De plus, cette hypothèse sera testé dans un second projet.

6 Can Probiotics Interfere with the Quorum Sensing System of *Clostridioides difficile*?

Est-ce que les probiotiques pourraient interférer avec le système de communication bactérienne de *Clostridioides difficile*?

Auteurs :

Gunaratnam S¹, Millette M², Auclair J², McFarland LV³, Lacroix M¹

¹ Institut National de Recherche Scientifique- Institut Armand-Frappier (INRS-IAF)

² Bio-K Plus International Inc.

³ Department of Medicinal Chemistry, University of Washington, Seattle WA, USA

Corresponding author: Professor Monique Lacroix, Monique.lacroix@iaf.inrs.ca

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Article en préparation pour publication à *Current Opinion in Microbiology*

SG a fait la revue de la littérature. SG et MM ont rédigé la publication. SG a reproduit les illustrations. MM, LVMF, JA et ML ont révisé le manuscrit et guider pour le contenu son contenu et son interprétation.

6.1 Abstract

As new microbiologic tools and assays are developed and utilized in research models, our understanding in the complexities of microbial interactions and mechanisms of how the microbiome acts is expanding. Implementation of these new findings has been challenging to apply to clinical applications. One focus of how the microbiome might influence well-being has been in the field of therapeutic use of probiotics. The goal of this review is to update our understanding of this complex area and examine how probiotics may influence microbial quorum sensing (QS). A review has been done from PubMed in order to retrieve all the literature related to the impact of probiotics on bacterial QS more precisely on *C. difficile*. This review was done with information collected from the beginning of 21th century until now. This review describes the two main QS system of *C. difficile*: the *agr* and *lux* system. This review determined that there are several lines of evidence that demonstrate the impact of probiotics on the QS system of *C. difficile*. We also explain how other antimicrobial agents secreted by the microbiota are able to interfere with *C. difficile*. Briefly, it is possible to see that there are multiple ways that can be employed in order to survive pathogenic bacteria, such as *C. difficile*, but interfering with the QS system is a new approach.

6.2 Résumé

Avec l'avancement de la recherche de nouveaux outils et essais microbiologiques sont développés et utilisés dans différents modèles de recherche. Ainsi, notre compréhension de la complexité des interactions microbiennes et des mécanismes du microbiote intestinal est en pleine expansion. Mais, l'utilisation de ses nouvelles découvertes pour des applications en clinique est très complexe. L'un des intérêts principaux est de savoir comment le microbiome peut influencer le bien-être et comment l'usage thérapeutique des probiotiques peut améliorer la qualité de vie. Le but de cet article est de mettre à jour notre compréhension sur ce domaine complexe et voir comment les probiotiques peuvent influencer la communication bactérienne. Une revue de la littérature a été effectuée sur Pubmed afin de trouver toutes les informations relatives à l'impact des probiotiques sur le QS system des bactéries plus précisément de *C. difficile*. Cet article regroupe les informations recueillies à partir du début du 21^{ème} siècle jusqu'à nos jours. Cette revue décrit les deux principaux systèmes de communication de *C. difficile*: le système *agr* et *lux*. Cette revue a déterminé qu'il existe plusieurs preuves démontrant l'impact des probiotiques sur le système QS de *C. difficile*. Cependant, l'article met en évidence également d'autres agents antimicrobiens capables d'interférer avec *C. difficile*, y compris la résistance à la colonisation par le microbiote. En résumé, plusieurs façons peuvent être employées afin de contrer les bactéries pathogènes telles que *C. difficile*, mais l'interférence de la communication bactérienne est une nouvelle façon.

In USA, as well as in other industrialized countries, one of the most important cause of nosocomial diarrhea in hospitals and long-term care facilities is *C. difficile* (CD). CD infections (CDI) are not only a significant financial burden on the healthcare system (up to \$4.8 billion healthcare dollars/year), but also a growing problem, as CDI rates continue to increase (Evans & Johnson, 2015). *C. difficile* is a strict anaerobic spore-forming, Gram-positive bacillus found in the intestinal microbiota of 2 to 5% of healthy adults and in 10 to 20 % of the elderly (ASPC, 2014). CDI occurs most commonly after the microbiota has been disrupted by antibiotic exposure. Other than antibiotic use, compromised host immunity, gastric acid-altering medications, co-morbidities, and admission to a healthcare facility are known CDI risk factors (McFarland *et al.*, 2016; Surawicz, 2007). Once dysbiosis occurs, *C. difficile* may colonize the intestine and produce toxins to initiate disease. The initial episode of CDI develops when colonization resistance is reduced by antimicrobial therapy or other risk factors. Some patients develop recurrent episodes of CDI, despite *C. difficile* specific antibiotic therapy, which has led to a search for innovative treatments that may involve other areas of CDI pathogenesis.

6.3 Microbiota, next-generation probiotics and colonization resistance

One of the most important role of the gut microbiota is to bestow colonization resistance to the host in order to confer protection against various bacterial, viral, fungal and protozoan infections (Perez-Cobas *et al.*, 2015). Recently, new mechanisms of action have been proposed to explain the impact of gut microbes. For example, Buffier and Pamer used next-generation sequencing technologies and compared bacterial abundance and microbial genes before and after antibiotic treatment in a mice model (Buffie & Pamer, 2013). They demonstrated that antibiotics reduced the alpha and beta diversity of the gut microbiota and the treated mice were much more susceptible to *C. difficile* infection. This altered colonization resistance was inferred to be caused by the loss of 7 α -dehydroxylation, a key enzymatic activity in the transformation of primary to secondary bile acids. This specific activity belongs to *Clostridium scindens*, which has been abolished by antibiotic treatment. Addition of this bacterium alone conferred a normal colonization resistance to the mice and prevented further CDI. Recently, Solbach *et al* have shown the prevalence of the *baiCD* cluster correlates negatively with CDI in human stool and that fecal transplant successfully reconstituted the cluster and helped to treat the patient (Solbach *et al.*, 2018). Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by numerous bacterial

species, including intestinal inhabitants. Some bacteriocins have been shown by Gebhart *et al* (2015) to inhibit *C. difficile* growth. (Gebhart *et al.*, 2015) These authors used a modified R-type bacteriocin to prevent antibiotic-induced *C. difficile* colonization in a mice model. They showed that this specific bacteriocin was able to neutralize *C. difficile* without altering the gut microbiota.

Human-derived *L. reuteri* is able to convert glycerol to the broad-spectrum antimicrobial compound reuterin. Spinler *et al* (2017) successfully used that probiotic bacteria to prevent *C. difficile* colonization of a complex human fecal microbial community (Spinler *et al.*, 2017). Ng *et al* (2013) demonstrated that antibiotic-induced disruption of gut microbiota increased sialic acid concentration and that this allowed *Salmonella typhimurium* and *C. difficile* overgrowth (Ng *et al.*, 2013). They showed sialidase activity is important to reduce host-specific sugars liberated from the intestinal mucus by commensal bacteria. Thus, they demonstrated another mechanism by which the gut microbiota can control pathogen proliferation.

Current treatments of CDI not only damage the intestinal microbiota but also induce recurrences. Hence, a non-antimicrobial treatment is needed. A list of non-antimicrobial treatments against CDI are described in Table 7.3. To find the best treatment, it is important to analyse all the virulence and persistence factors of *C. difficile* which are the main reasons for infection, as shown in Figure 7.1. Sporulation, toxin secretion and other non-toxigenic factors such as flagella are targets that may be able to reduce or kill the bacteria. In order to do so, one of the major circuits playing a crucial role in toxin secretion, synthesis of flagella and many others virulence factors is the quorum sensing (QS) system. If one of the components of this bacterial communication is altered by the specific treatment, there is possibility to attenuate the infection.

6.4 Quorum Sensing

Prior investigations into the cross-talk of microbes have been limited due to the lack of specific tools or microbial assays for the complex interactions of the microbiome. On the other hand, some scientists did not believe that microbes communicated within complex microbial populations. More recent studies show that bacteria communicate together by secreting chemical molecules, which enable the microbes to coordinate their behavior, called Quorum Sensing (QS) (Miller & Bassler, 2001). QS is an inter-bacterial communication system that depends on the bacterial density and is based on the synthesis and diffusion of small chemical molecules called autoinducers (AI). With a high bacterial load, the concentration of these

autoinducers increase. When the concentration of autoinducers reach a threshold, bacteria sense and activate an intracellular complex that regulates the expression of different genes. Individual species of bacteria often use more than one type of chemical signal to communicate (Miller & Bassler, 2001). Gram positive and negative bacteria use QS to communicate. However, the molecules used to communicate can differ. Gram positive bacteria secrete peptides as autoinducers. In contrast, Gram negative bacteria release acylated homoserine lactone (HSL) as autoinducers (Miller & Bassler, 2001). Bacterial QS signals can also be sensed by eukaryotic organisms, plants and animals (Grandclement *et al.*, 2016). QS was first discovered in two bioluminescent marine bacterium *Vibrio harveyi* and *V. fischeri* by Woody Hasting (Miller & Bassler, 2001). He observed that light was emitted only at high bacterial cell density. *V. harveyi* is a free living bacterium whereas *V. fischeri* lives as a symbiont in a number of marine animals. Therefore, the QS of *V. fischeri* was intensely studied (Miller & Bassler, 2001).

A general model of QS in Gram negative bacteria is mediated by two main proteins LuxI and LuxR, which are similar to *V. fischeri* regulatory proteins. AI are usually synthesized by LuxI proteins. When cell density increases, the concentration of autoinducers tends to reach a threshold which activates the LuxR-autoinducer complex to bind to the *luxCDABE* promotor and activate transcription of this operon (Miller & Bassler, 2001).

In the general Gram positive bacteria pathway, the autoinducer molecule is transported by ATP-binding cassette (ABC) transporter out of the cell. Contrary to Gram negative bacteria, AI are detected by a two-component signaling system which is composed of a histidine sensor kinase receptor and a response regulator. When a threshold is reached, the sensor kinase autophosphorylates on a conserved histidine residue (H) and the phosphate group is transferred to the cognate response regulator which activates the transcription of genes controlled by QS (Miller & Bassler, 2001).

It has been demonstrated that bacteria can communicate within the same species, (intraspecies communication), but they can also communicate with different species known as interspecies communication. One of the well-known autoinducer molecules for interspecies communication is autoinducer-2 (AI-2). This molecule can be considered as an universal signal because it can be

found in several Gram-positive and Gram-negative bacteria (Pereira *et al.*, 2013). These autoinducers are synthesized by an homodimeric metalloenzyme under the name of *luxS* (Pereira *et al.*, 2013). *LuxS* is synthesized from S-adenosylmethionine (SAM) (Pereira *et al.*, 2013). SAM transfers a methyl group to S-adenosylhomocysteine (SAH), which is converted into S-ribosylhomocysteine (SRH) and adenine by 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (Pfs) (Pereira *et al.*, 2013). For the organisms that contain S-adenosylhomocysteine hydrolase (SahH) enzyme, it will produce homocysteine (Pereira *et al.*, 2013). Thereafter, *LuxS* converts its substrate, SRH, into homocysteine and 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) which results to AI-2 molecules (Surette *et al.*, 1999).

6.5 QS of *Clostridioides difficile*

In recent years, mounting evidence has pointed out that the virulence of *C. difficile* could be regulated by QS. Genomic analyses have demonstrated the presence of *luxS*/AI-2 homolog and the presence of *agr* locus in strains of *C. difficile* (Lee & Song, 2005; Martin *et al.*, 2013). However, the *C. difficile* QS system is currently poorly understood.

After invasion into epithelial cells, *C. difficile* secretes its toxins A and B, which disrupt the tight junctions between the intestinal cells and cause the loss of integrity (Abt *et al.*, 2016). There are also three other proteins that are encoded by the PaLoc locus: *tcdC*, *tcdE* and *tcdR* (Abt *et al.*, 2016). *TcdR* is a sigma factor known to help activate the binding of RNA polymerase to the promoters of *tcdA* and *tcdB* genes during the stationary phase of *C. difficile*. *TcdC* is known to play the role of an anti-sigma factor and acts to repress the transcription of *tcdA* and *tcdB*. *TcdE* seems to be involved in the secretion of *tcdA* and *tcdB* in strains of *C. difficile* resulting with high secretion of toxins (Govind *et al.*, 2015).

In an *in vitro* model, cell-free supernatant of *C. difficile* from mid-log phase, which contain AI-2 molecules, was exposed to early-log phase of *C. difficile*. In this assay, it was demonstrated that the addition of AI-2 molecules activated the transcription of some genes located in the PaLoc locus (*tcdA*, *tcdB* and *tcdE*) when added early in the growth stage. However, when the toxin levels were measured, there was not an increase of toxin A proteins. Also, the effect was not seen when AI-2 was added after 24h nor 48h of bacterial growth (Carter *et al.*, 2005). Other data suggest, that a pair of genes named *rolA* and *rolB* precede the *luxS* gene and play a role in the production of AI-2 molecules in *C. difficile* (Carter *et al.*, 2005). Until now, genomic analysis has demonstrated an identity of 40% and similarity of 57% between *LuxS* protein of *V. harveyi* and *C. difficile*. Hence, the exact QS pathway involved in CDI is still unclear.

A major catechin compound found in green tea (Epigallocatechin Gallate) has demonstrated an inhibitory effect on *C. difficile* virulence factors by repressing *luxS* gene expression (Yun *et al.*, 2015). The repression of *luxS* leads to the decrease of AI-2 molecules and the downregulation of *tcdA* and *tcdR* genes (Lee & Song, 2005).

Recently it has also been shown that the QS of *C. difficile* can be regulated by the accessory gene regulator (*agr*) that is well known in *Staphylococcus aureus* (Martin *et al.*, 2013). The synthesis of toxins by *S. aureus* is controlled by the operon *agr* called *agrACDB* (Recsei *et al.*, 1986; Tegmark *et al.*, 1998). The *agrD* gene encodes for a pre-peptide that is transformed to small peptide called an autoinducer when it translocates through the transmembrane protein AgrB. After the concentration of these autoinducers reaches a threshold, it activates the sensor kinase AgrC, which initiates phosphorylation of AgrA. Phosphorylated AgrA acts as a positive regulator of the virulence factors by binding to the C-terminal of the LytTR domain of the DNA (Koenig *et al.*, 2004; Leonard *et al.*, 2012). AgrA is known to play a crucial role in the expression of virulence factors.

In *C. difficile* R20291, a homologous system has been observed by genomic comparison. This analysis revealed the presence of the *agr* locus which included *agrA*, *agrC*, *agrD* and *agrB* therefore these genes are in reverse order compare to *S. aureus*. (See Figure 7.2). The polypeptide AgrD observed in *S. aureus* has no significant similarity with *C. difficile* hence, *agrA*-encoded, *agrB*-encoded and *agrC*-encoded proteins share 28, 25 and 23% amino acid identity. The difference observed in AgrD polypeptide is commonly seen in different strains of *S. aureus*.

Several *C. difficile* genomes have been analysed and identified with an incomplete *agr* locus, named *agr1*, which contains *agrD1B1*. In ribotype 027 isolate R20291, a complete *agr* locus, *agrA2C2B2D2* has been identified and named *agr2*. The *agr1* locus contains the QS signal molecule generation pathway and the *agr2* contains the signal generation pathway as well as the sensing and regulation pathway. Interestingly, all virulent strains of *C. difficile* have the *agr1* loci while only hypervirulent strains have the *agr2* loci. Recently, it has been demonstrated that the deletion of the *agrB1D1* in *C. difficile* 630 and *C. difficile* NAP1/027 R20291 resulted in not only the loss of toxin production but also inhibition of mRNA transcripts of toxin genes (*tcdA* and

tcdB) resulting in non-virulent strains (Darkoh *et al.*, 2016). On the contrary, the *C. difficile* NAP1/027 R20291 *agrB2D2* mutant, harboring wild-type *argB1D1*, kept its toxigenic properties. The production of the signal molecule and the toxin gene transcript were still seen in R20291 *agr2* mutant. These results highlight the importance of *agrB1D1* locus in the virulence of *C. difficile* and make it an interesting therapeutic target for *C. difficile* infection treatment. However, the reason why strains, such as *C. difficile* 630, are able to produce toxins while it does not possess the sensing and regulation pathway has yet to be elucidated.

Darkoh *et al.* (2015) have demonstrated that the *C. difficile*-stationary phase supernatant can induce early toxin production. Normally, the vegetative cells of *C. difficile* strain 630 take about 16 hours to produce and secrete toxins at a detectable level. However, when supernatant from the stationary phase is added to a culture of *C. difficile* strain 630, the toxins can be detected within 4 hours (Darkoh *et al.*, 2015). They have shown that the toxin production by *C. difficile* can be regulated by a quorum signaling thiolactone peptide. Additionally, the supplementation of the toxin-inducing signal (TI signal), which is the thiolactone peptide, induces an early transcription of *tcdA* and *tcdB* in *C. difficile* strain 630 within four hours (Darkoh *et al.*, 2015). Also, after a mutation of *agrA*, a decrease in toxin production has been observed (Darkoh *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2013). They have suggested several therapeutic targets which are components of the *agr1* and *agr2* loci that are illustrated in Figure 7.2.

6.6 QS inhibition strategies

QS inhibitors

Parameters such as temperature or pH are factors which can affect the half-life of QS signals (Grandclement *et al.*, 2016). Furthermore, QS inhibitors and quorum quenching enzymes can also play a role in interrupting the bacterial communication. QS inhibitors (QSI) are chemicals that can disrupt the QS system by inhibiting the QS pathway. They can be produced by a wide range of organisms such as bacteria, fungi, plants and animals from marine or freshwater ecosystems (Grandclement *et al.*, 2016). Until now, several QSIs have been discovered by a

screening approach on organisms using biosensors. However, only a few active compounds have been fully characterized. Different methods such as colometric assay, QSI selector system, high-throughput screening, screening of synthetic compounds, screening of natural sources such as human sexual hormone estrone, or drug design by synthesis of chemical signal or signal precursor analogs of previously identified QSIs are methods that were employed in order to identify interesting QSI molecules (Grandclement *et al.*, 2016). QSIs can interfere with several steps of the QS system such as the synthesis of autoinducers, the cell to cell exchange and transport of QS signal or the QS signal perception and response.

One of the drug design models that has been developed for *S. aureus* in order to trick the transcription of virulence factors was to create a truncated form of AIP thiolactone peptide. By creating AIP analogs, they were able to block the activation of the *agrC* receptor, which autophosphorylates when AIP binds and inhibit the rest of the cascade (Lyon *et al.*, 2000). This kind of drug can be also tested in other Gram positive bacteria with the same kind of communication pathway such as *C. difficile*. In Gram positive bacteria, autoinducers are produced by the precursor *agrD* and secreted by the *agrB* after a cleavage of the N-terminal segment of the pro-AIP peptide (Grandclement *et al.*, 2016). It has been demonstrated that ambuic acid, a fungal secondary metabolite, can block the synthesis of the autoinducer AIP (Nakayama *et al.*, 2009). Ambuic acid, containing a proline residue, is able to inhibit the cleavage of the N-terminal by *agrB* (Nakayama *et al.*, 2009).

The inhibition of the transportation and exchange of QS signal from cell to cell is also a mode of action by QSI molecules. This is often done by sequestering the QS signal molecule. In *S. aureus*, an Apolipoprotein B was described to have a sequestering role on QS signals (Peterson *et al.*, 2008). In order to activate the cascade of virulence expression in *Escherichia coli*, the AI-2 signal needs to enter the cell by a transporter. The cytoplasmic enzyme LsrK phosphorylates AI-2 after its transportation into the cell. Hence, if the enzyme is translocated outside the cell, the enzyme would phosphorylate the AI-2 extracellularly which would change the conformation of the molecule and would block its import into the cell (Roy *et al.*, 2010).

The perception and response of QS signal can also be inhibited. Using an high-throughput screening platform, Sully *et al.* (2014) isolated an *S. aureus* virulence inhibitor called Savirin (Sully *et al.*, 2014). In Gram positive bacteria, when the extracellular concentration of

autoinducer reaches a threshold level, the C-terminal of the sensor histidine kinase, *agrC*, phosphorylates and activates the cytoplasmic response regulator, *agrA*, by phosphorylation. This phosphorylation activates *agrA* to bind to the promoter region and transcript not only the genes related to the virulence factors but also of QS system. It has been demonstrated that Savirin, Naringenin and Ω -hydroxyemodin (OHM), would be able to repress the activity of *agrA*, therefore inhibit the transcription of its virulence factors (Daly *et al.*, 2015; Sully *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). Others have shown that Cochimicin, Avellanin and Solonamide B cyclodepsipeptide can act as competitive inhibitors of AgrC protein (Wang & Muir, 2016).

In *S. aureus*, after phosphorylation of the AgrA protein, AgrA binds to the promoter P2(RNAII) and P3 (RNAIII). RNAIII is responsible for the expression of virulence factors and RNAII responsible of the expression of *agr* related genes in *S. aureus*. Hence, targeting these promoters can be beneficial in order to attenuate *S. aureus* virulence. RNA-III inhibiting peptide (RIP) have been found to be able to inhibit synthesis of biofilm formation, reduce bacterial adherence to mammalian cells and *agr* transcription (Gov *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2016b)

Quorum quenching

Quorum quenching (QQ) is a mechanism that uses enzymatic activity to interrupt QS (Zhou *et al.*, 2016a). QQ has been suggested as a strategy for disrupting the ability of a pathogen to sense its cell density and also to modulate their virulence factors. Some data suggest that QQ can be employed as a novel non-antibiotic therapy against certain bacterial diseases (Tang & Zhang, 2014). The first QQ discovered was the AiiA, an enzyme from *Bacillus* species that inactivates the acylhomoserine lactone (AHL) which is the QS signal of *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) (Dong *et al.*, 2000). The clinical applications of QQ have yet to be determined. QQ enzymes can be found in QS and non-QS of Gram positive and Gram negative bacteria. (Chen *et al.*, 2013). The mode of action of QQ enzymes is mostly an enzymatic degradation of the QS signals or the degradation of QS signal during the transduction pathway. Lactonase, acylase, oxidoreductase and paraoxonase are examples of QQ enzymes (Utari *et al.*, 2017). Acylase enzyme helps to hydrolyse the amide bond between the homoserine lactone and acyl chain ring. The lactonase enzyme helps to open the homoserine lactone ring and oxidoreductase modifies the AHLs by oxidizing or reducing the acyl chain (Utari *et al.*, 2017). There are several bacteria such as *Bacillus* (Dong *et al.*, 2002), *Agrobacterium*

(Carlier *et al.*, 2003), *Streptomyces* (Park *et al.*, 2005), *Pseudomonas* (Sio *et al.*, 2006), *Rhodococcus* (Park *et al.*, 2006) whom have demonstrated an anti-AHL effect. AiiA has been noted to have a bactericidal activity against several Gram positive bacteria (Grandclement *et al.*, 2016). A study related to the tobacco rhizosphere demonstrated that they were able reduce the pathogenicity of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in potato tubers by interfering with its QS system. Antibody based QQ enzyme is another method that has been studied in various animal models in the past years. They have demonstrated that antibodies against α -hemolysin, which encodes toxin genes, can protect the host from *S. aureus* infections (Hua *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2018).

Research related to the QQ activity in Gram positive bacteria is still ongoing. Several metabolites and anti-agr compounds have been identified until now yet there is not any QQ enzymes or QSI that have been identified against *C. difficile*. Thus, due to the similarity between the communication pathway of *C. difficile* and *S. aureus* it is possible to be able to find a similar anti-agr compound. Therefore, research has to be continued. Most treatment strategies used to treat *C. difficile* are based on antibiotics, but using QQ enzymes and QSI, could treat the infection by making the bacteria less virulent without worrying about resistance.

6.7 Probiotics

Several clinical studies show that probiotics can be used for prevention of gastrointestinal tract (GIT) infections, the mechanisms are not yet fully understood (Hill *et al.*, 2014; McFarland *et al.*, 2018a). Several modes of action (MoAs) have been formulated in the past years, such as production of an antimicrobial metabolites, modulation of the immune system or reinforcement of the intestinal barrier (Oelschlaeger, 2010). Another novel pathway that seems very interesting currently is by interfering with the bacterial QS.

Antibiotic resistance is an increasing problem and the available options to treat bacterial infections are limited, leading to the search for a novel non-antibiotic therapies, such as probiotics (McFarland, 2016). Probiotics are defined as “living microorganisms, which when administrated in adequate amounts, confer a benefit on the host (FAO/WHO, 2001); Hill, 2014). They are known to enhance and maintain the human gastrointestinal microbiota (O'Hara & Shanahan, 2007). Even though numerous clinical studies show that various probiotics can be used for prevention of GIT infections, the mechanism by which it actually works is still being investigated. Probiotics are known to exhibit an inhibitory effect on various pathogens (Carey *et al.*, 2008; Meurman *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1987).

Regardless of different treatments and advances for the treatment of CDI, the prevention for CDI is still a challenge in the healthcare settings (Evans & Johnson, 2015). A recent study found that clinical efficacy of probiotics is both strain-specific and disease-specific, so not all probiotic strains are equally effective (Sniffen *et al.*, 2018). Several meta-analysis and systematic reviews have shown that certain types of probiotics can be effective as a primary prevention of CDI in patients taking antibiotics (Dendukuri *et al.*, 2005; Goldenberg *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2012; Johnston *et al.*, 2012; McFarland, 2006). Most of the data suggest a specific combination of *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2 (Bio-K+) for primary prevention of CDI or the *S. boulardii* strain CNCM I-745 for the secondary prevention of CDI (Evans & Johnson, 2015; Johnson *et al.*, 2012; McFarland, 2006; McFarland *et al.*, 2018b). There are several MoAs that have been proposed to elucidate the efficacy of a probiotic to prevent CDI. In order to limit colonization by pathogenic bacteria, resistance to colonization is an important factor. 'Colonization resistance' includes the secretion of metabolites such as bacteriocins, organic acids, peroxide or any biosurfactant with antimicrobial activity (Brian, 2016). The second mode of action that can be described is the enhancement of the intestinal mucosal barrier (Brian, 2016). Probiotics can produce proteins that reinforces the tight junction between the intestinal epithelial cells (Brian, 2016). They can also promote different cells such as Paneth cells who produce antimicrobial peptides, and mucus cells whom provide a protective layer by secreting mucus (Brian, 2016). The third mode of action of probiotics can be via the stimulation of the immune system. Probiotics can have several effects by stimulating different cytokines. (Menard *et al.*, 2008).

Several studies are now demonstrating that probiotics might be able to interfere with the QS system of bacteria (see Table 7.7). Recent advances have shown that cutting off the communication between bacteria can reduce their virulence factors. Currently, researchers are studying QS pathways to determine if certain strains of lactobacilli or other probiotic strains can modulate the QS system in *C. difficile* (Darkoh *et al.*, 2017; Yun *et al.*, 2014). During an *in vitro* study, Yun *et al.* 2014, observed a decrease in AI-2 activity in *C. difficile* in presence of cell extract of *L. acidophilus* GPIB. This measure was obtained by a *V. harveyi* coupled bioluminescence assay. A downregulation of the virulence genes in *C. difficile* was also seen (Yun *et al.*, 2014). The interference on the QS system of *C. difficile* is still under investigation (Darkoh *et al.*, 2015). It would be also interesting to verify if probiotics would be able to interfere directly or indirectly with the QS of *C. difficile* by producing a QQ enzyme.

Recently, a group have evaluated the impact of the presence of QQ enzyme producing bacteria on the *Aeromonas hydrophila* level in the gut (Zhou *et al.*, 2016a). The goal of the study was to evaluate the impact of QQ enzyme produced by the probiotic *Bacillus* sp. QSI-1 on AHLs produced by *A. hydrophila* in the fish intestine and to investigate the possible gut microbiota modulation. The results demonstrate that the QQ enzyme modulated the fish gut microbiota and the percentage of *A. hydrophila* was decreased (Zhou *et al.*, 2016a). Therefore, these data showed some interesting opening to new MoAs that can be explored in different probiotic strains. These QQ-producing probiotics can serve as a non-antibiotic therapy to control infectious disease.

Another group has demonstrated the ability of *Lactobacillus plantarum* to inhibit the production of AHL, the QS signal molecule that can induce the virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* (Valdez *et al.*, 2005). Also, *Lactobacillus reuteri* strain RC-14 is capable of producing small molecules which are able to interfere with QS system of *S. aureus*. This interference represses the expression of the TSST-1 gene encoding for the toxin related to toxic shock syndrome (Li *et al.*, 2011).

Briefly, probiotics can have an impact on the host by their capacity to modulate or to colonize the gut microbiota. They usually act on the components or via metabolites. Hence, the effect of a certain probiotics can differ from another one because of its strain specific activity (Brian, 2016; McFarland *et al.*, 2018a).

6.8 Conclusion

Colonization resistance is an important role of the intestinal microbiota by preventing outgrowth of intruders such as *C. difficile*. Several mechanisms such as production of antimicrobials are employed in order to eradicate or prevent this type of infection. Recurrence and dysbiosis of the microbiota can be two major restrictions in finding the best treatment. Current treatments for CDI are mostly antibiotics which leaves a door open for dysbiosis and recurrences. Therefore, a nonantimicrobial treatment that can reverse dysbiosis is needed. Probiotics not only help maintain a balance but also reinforce the colonization resistance capability of the microbiota. There are several other nonantimicrobial treatments that can be suggested. Also, QS is one of the key players in secretion of virulence factors in bacteria. Therefore, if a probiotic can reverse dysbiosis and are able to secrete a metabolite that can interfere with the bacterial communication of the pathogens it would bring new tools to fight off these deadly infections.

6.8.1 Funding

This research was funded by the Natural Science Engineering Research Council of Canada (NSERC), grant number “CRDPJ 505365-16” and Bio-K+ International Inc.

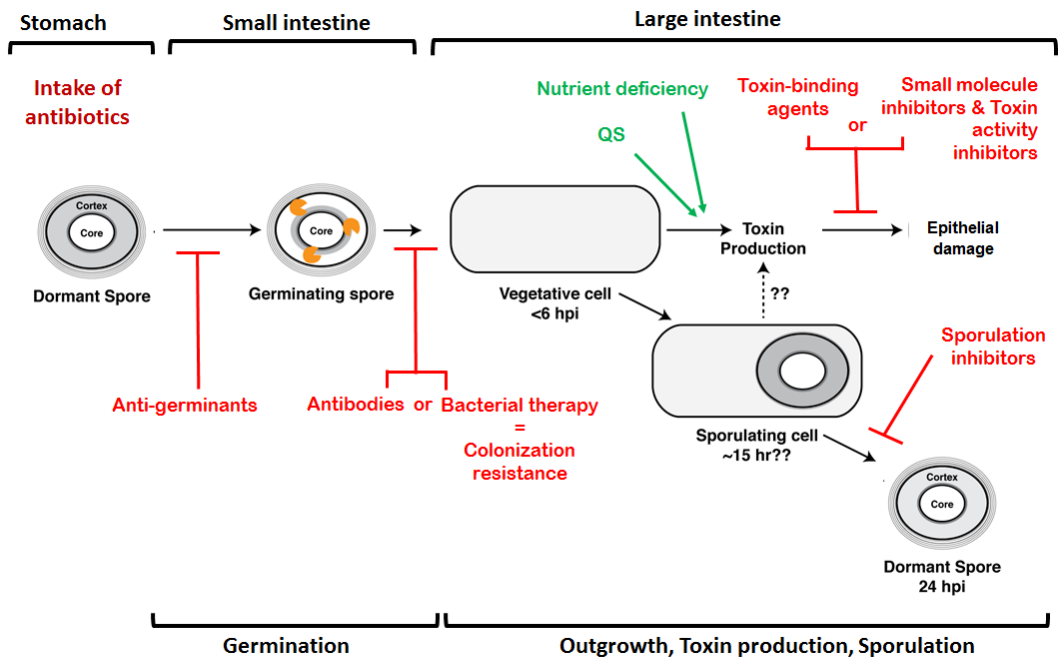


Figure 7.1 Targets in the life cycle of *C. difficile* for therapeutic use adapted from Shen *et al* 2015 (Shen, 2015)

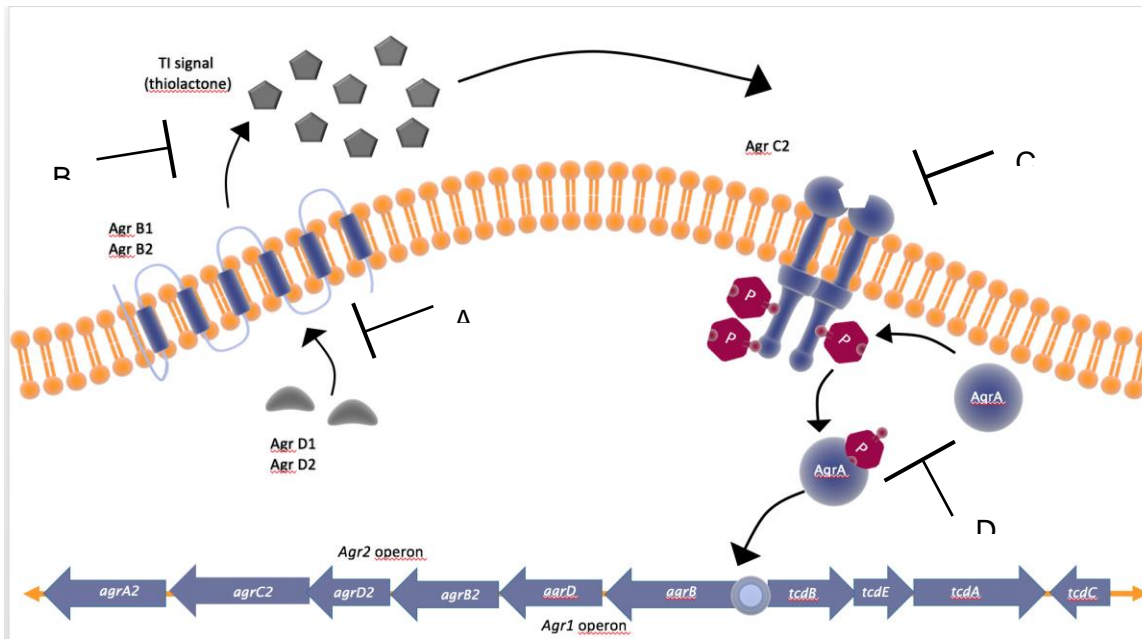


Figure 7.2

The Agr System in *Clostridium difficile* and the potential targets. The Agr system is composed of two agr loci: *agr1* and *agr2*. *Agr1* is an incomplete locus which contains the propeptide agrD1 and the transmembrane protein agrB1, present in all strains of *C. difficile*. The agrB1 is responsible of processing the agrD1 in order to secrete AIP molecules. *Agr2* is a complete locus found in certain strains of *C. difficile* which is composed of the propeptide, agrD2; a transmembrane protein responsible for the proteolysis of the propeptide, agrB2; a response regulator composed of agrA2 and a histidine sensor kinase agrC2. After the processing of the propeptide into AIP molecules, when a threshold is meet, communication signal molecule activates agrC2 which phosphorylates agrA2. Phosphorylated AgrA2 initiates transcription of agr genes and genes related to the virulence of *C. difficile* such as toxins and flagellar system. Several steps of the signalling pathway can be blocked such as (A) the synthesis of AIP (B) inhibition of the communication molecules by analogues or antibodies (C) blocking the binding of AIP to the sensory histidine kinase (AgrC2) (D) the phosphorylation of the response regulator (AgrA2) (Illustrated by using Somersault)

Table 7.3 Nonantimicrobial targets to treat or prevent CDI

Non-antimicrobial treatments	Functions	Examples	References
Antigermination agents	Sporulation inhibitors	Deoxycholic acid, lithocholic acid, ursodeoxycholic acid, ω -muricholic acid	(Darkoh <i>et al.</i> , 2017)
	Antigerminants	Chenodeoxycholic acid, α and β stereoisomers of muricholic acid	(Darkoh <i>et al.</i> , 2017)
Targeting the toxins	Toxin-binding agents	X-aptamers, tolevamer, cholestyramines, and colestipol.	(Hamula <i>et al.</i> , 2015; He <i>et al.</i> , 2012)
	Small-molecule-based inhibition of toxin production & toxin activity	Drugs that inhibit the Agr pathway	(Darkoh <i>et al.</i> , 2017)
Bacteriotherapy		-Fecal microbiota transplantation (FMT) -Use of probiotics Bacteria : <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> Yeast : <i>Saccharomyces boulardii</i>	(Eiseman <i>et al.</i> , 1958; Gao <i>et al.</i> , 2010; Hedge <i>et al.</i> , 2008; Hui <i>et al.</i> , 2019)
Immunotherapy	Monoclonal antibodies against the toxins	Actoxumab and Bezlotoxumab Biologically active anti-A/B toxin IgY-loaded chitosan-Ca pectinate oral microbeads	(Lowy <i>et al.</i> , 2010; Xing <i>et al.</i> , 2017)
	Immunization	ACAM-CDIFF vaccine	(Martin & Wilcox, 2016)
	Antibodies to other <i>C. difficile</i> targets	Antibodies that target: Flagella Cell wall proteins or adherent factors	(Bender <i>et al.</i> , 2015; Pechine <i>et al.</i> , 2007)

Table 7.7 Probiotics known to interfere with QS of bacteria

Host	Mechanism of Action	Result	Reference
<i>Lactobacillus plantarum</i> PA 100	Inhibition of acyl-homoserine lactone activity and blockage of their synthesis in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Decrease significantly elastase and biofilm formation	(Valdez <i>et al.</i> , 2005)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	Blocks QS system of <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 with active molecules (not identified yet)	Interference with EHEC's virulence factors (prevent adherence, colonization and QS)	(Medellin-Pena & Griffiths, 2009)
<i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	Produces bioactive cyclic dipeptides (also known as 2,5-diketopiperazines, or DKPs) who interfere with <i>Staphylococcus aureus</i> MN8 QS	Inhibition of TSST-1 production	(Li <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> GP1B	Reduces production of AI-2 molecules by <i>Clostridium difficile</i>	Inhibits growth of <i>C. difficile</i> but also virulence genes	(Yun <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 393), <i>L. reuteri</i> (ATCC23272), <i>L. plantarum</i> (ATCC14917) and <i>L. salivarius</i> (ATCC11741)	Inhibition of QS genes <i>vicKR</i> and <i>comCD</i> in <i>Streptococcus mutans</i>	Inhibit biofilm formation and also other virulence factors	(Wasfi <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bacillus subtilis</i> KATMIRA1933	Produces Subtilosin A, cyclic lantibiotic protein against QS molecules of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i>	Antibacterial and anti-biofilm activity	(Algburi <i>et al.</i> , 2017)

<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lim2</i>	Reduces the AI-2 activity of <i>C.difficile</i>	QS (<i>luxS</i>) and the virulence factors (<i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> and <i>tcdE</i>) were significantly suppressed	(Yong <i>et al.</i> , 2019)
---	--	--	--------------------------------

7 BIBLIOGRAPHIE

- Abt MC, McKenney PT & Pamer EG (2016) Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol* 14(10):609-620.
- Algburi A, Zehm S, Natrebov V, Bren AB, Chistyakov V & Chikindas ML (2017) Subtilosin Prevents Biofilm Formation by Inhibiting Bacterial Quorum Sensing. *Probiotics and antimicrobial proteins* 9(1):81-90.
- Allen SJ, Wareham K, Wang D, Bradley C, Hutchings H, Harris W, Dhar A, Brown H, Foden A, Gravenor MB & Mack D (2013) Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 382(9900):1249-1257.
- Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, Lawley TD & Finn RD (2019) A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* 568(7753):499-504.
- Ananthakrishnan AN (2011) Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8(1):17-26.
- Antunes A, Camiade E, Monot M, Courtois E, Barbut F, Sernova NV, Rodionov DA, Martin-Verstraete I & Dupuy B (2012) Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in Clostridium difficile. *Nucleic acids research* 40(21):10701-10718.
- Aranda PS, LaJoie DM & Jorcyk CL (2012) Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33(2):366-369.
- ASPC AdlspdC (2014) «Clostridium difficile Infection: epidemiology, risk factors and management ».
- Auclair J, Frappier M & Millette M (2015) Lactobacillus acidophilus CL1285, Lactobacillus casei LBC80R, and Lactobacillus rhamnosus CLR2 (Bio-K+): Characterization, Manufacture, Mechanisms of Action, and Quality Control of a Specific Probiotic Combination for Primary Prevention of Clostridium difficile Infection. *Clin Infect Dis* 60 Suppl 2:S135-143.
- Baktash A, Terveer EM, Zwitter RD, Hornung BVH, Corver J, Kuijper EJ & Smits WK (2018) Mechanistic Insights in the Success of Fecal Microbiota Transplants for the Treatment of Clostridium difficile Infections. *Front Microbiol* 9:1242.
- Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM & Lacroix M (2010) Probiotic Lactobacillus acidophilus and L. casei mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutrition and cancer* 62(3):371-378.
- Barnett JS (2012) Clostridium difficile: a new look at an old but increasingly deadly infection. *JAAPA* 25(1):32-36.
- Beausoleil M, Fortier N, Guenette S, L'Ecuyer A, Savoie M, Franco M, Lachaine J & Weiss K (2007) Effect of a fermented milk combining Lactobacillus acidophilus CI1285 and Lactobacillus casei in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol* 21(11):732-736.

- Bender KO, Garland M, Ferreyra JA, Hryckowian AJ, Child MA, Puri AW, Solow-Cordero DE, Higginbottom SK, Segal E, Banaei N, Shen A, Sonnenburg JL & Bogyo M (2015) A small-molecule antivirulence agent for treating *Clostridium difficile* infection. *Sci Transl Med* 7(306):306ra148.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C & Gil A (2012) Probiotic mechanisms of action. *Annals of nutrition & metabolism* 61(2):160-174.
- Bouillaut L, Dubois T, Sonenshein AL & Dupuy B (2015) Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Research in microbiology* 166(4):375-383.
- Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M & von Eichel-Streiber C (1996) Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181(1-2):29-38.
- Brian NLH (2016) *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology*. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey. 520 p
- Buffie CG & Pamer EG (2013) Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 13(11):790-801.
- Cadle RM, Mansouri MD, Logan N, Kudva DR & Musher DM (2007) Association of proton-pump inhibitors with outcomes in *Clostridium difficile* colitis. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 64(22):2359-2363.
- Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S & Thompson S (2008) The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods* 73(2):125-132.
- Carlier A, Uroz S, Smadja B, Fray R, Latour X, Dessaux Y & Faure D (2003) The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Appl Environ Microbiol* 69(8):4989-4993.
- Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR & Rood JI (2007) Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J Bacteriol* 189(20):7290-7301.
- Carter GP, Purdy D, Williams P & Minton NP (2005) Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a luxS-type signalling system. *J Med Microbiol* 54(Pt 2):119-127.
- Carter GP, Rood JI & Lyras D (2012) The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol* 20(1):21-29.
- Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT & Pothoulakis C (1999) *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and immunity* 67(1):302-307.
- CDC Cfscap- (2015) *Nearly half a million Americans suffered from Clostridium difficile infections in a single year* <https://www.cdc.gov/media/releases/2015/p0225-clostridium-difficile.html>
- Cheikhoussef A, Pogori N, Chen W & Zhang H (2008) Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. *International journal of food microbiology* 125(3):215-222.
- Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z & Li X (2013) Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International journal of molecular sciences* 14(9):17477-17500.

- Cherrington CA, Hinton M, Pearson GR & Chopra I (1991) Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *The Journal of applied bacteriology* 70(2):161-165.
- Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP & O'Toole PW (2011) Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1:4586-4591.
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, Society for Healthcare Epidemiology of A & Infectious Diseases Society of A (2010) Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 31(5):431-455.
- Cowan ST, Shaw C & Williams RE (1954) Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *Journal of general microbiology* 10(1):174-176.
- Daly SM, Elmore BO, Kavanaugh JS, Triplett KD, Figueroa M, Raja HA, El-Elimat T, Crosby HA, Femling JK, Cech NB, Horswill AR, Oberlies NH & Hall PR (2015) omega-Hydroxyemodin limits *Staphylococcus aureus* quorum sensing-mediated pathogenesis and inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 59(4):2223-2235.
- Darkoh C, Deaton M & DuPont HL (2017) Nonantimicrobial drug targets for *Clostridium difficile* infections. *Future Microbiol* 12:975-985.
- Darkoh C, DuPont HL, Norris SJ & Kaplan HB (2015) Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. *MBio* 6(2):e02569.
- Darkoh C, Odo C & DuPont HL (2016) Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of *Clostridium difficile*. *MBio* 7(4).
- Dembek M, Stabler RA, Witney AA, Wren BW & Fairweather NF (2013) Transcriptional analysis of temporal gene expression in germinating *Clostridium difficile* 630 endospores. *PLoS One* 8(5):e64011.
- Dendukuri N, Costa V, McGregor M & Brophy JM (2005) Probiotic therapy for the prevention and treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review. *CMAJ* 173(2):167-170.
- Dineen SS, Villapakkam AC, Nordman JT & Sonenshein AL (2007) Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol Microbiol* 66(1):206-219.
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL & Zhang LH (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 68(4):1754-1759.
- Dong YH, Xu JL, Li XZ & Zhang LH (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3526-3531.
- Duncan SH, Louis P, Thomson JM & Flint HJ (2009) The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 11(8):2112-2122.
- DuPont HL, Garey K, Caeiro JP & Jiang ZD (2008) New advances in *Clostridium difficile* infection: changing epidemiology, diagnosis, treatment and control. *Current opinion in infectious diseases* 21(5):500-507.

- Dupuy B & Sonenshein AL (1998) Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Molecular microbiology* 27(1):107-120.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE & Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728):1635-1638.
- Eiseman B, Silen W, Bascom GS & Kauvar AJ (1958) Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 44(5):854-859.
- Evans CT & Johnson S (2015) Prevention of *Clostridium difficile* Infection With Probiotics. *Clin Infect Dis* 60 Suppl 2:S122-128.
- FAO/WHO FaAOotUNaWHO (2001) Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with live Lactic Acid Bacteria
- Fredua-Agyeman M, Stapleton P, Basit AW, Beezer AE & Gaisford S (2017) In vitro inhibition of *Clostridium difficile* by commercial probiotics: A microcalorimetric study. *International journal of pharmaceutics* 517(1-2):96-103.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC & Van Immerseel F (2006) Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 72(1):946-949.
- Gao XW, Mubasher M, Fang CY, Reifer C & Miller LE (2010) Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *Am J Gastroenterol* 105(7):1636-1641.
- Gebhart D, Lok S, Clare S, Tomas M, Stares M, Scholl D, Donskey CJ, Lawley TD & Govoni GR (2015) A modified R-type bacteriocin specifically targeting *Clostridium difficile* prevents colonization of mice without affecting gut microbiota diversity. *MBio* 6(2).
- Genth H, Dreger SC, Huelsenbeck J & Just I (2008) *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(4):592-597.
- Giau VV, Lee H, An SSA & Hulme J (2019) Recent advances in the treatment of *C. difficile* using biotherapeutic agents. *Infection and drug resistance* 12:1597-1615.
- Gill HS & Rutherford KJ (2001) Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *The British journal of nutrition* 86(2):285-289.
- Goldenberg JZ, Ma SS, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, Guyatt GH & Johnston BC (2013) Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD006095.pub3(5):CD006095.
- Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CK, Beardsley J, Mertz D & Johnston BC (2017) Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 12:CD006095.
- Goldstein EJ, Johnson S, Maziade PJ, McFarland LV, Trick W, Dresser L, Millette M, Mazloum H & Low DE (2015) Pathway to Prevention of Nosocomial *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 60 Suppl 2:S148-158.

- Gov Y, Bitler A, Dell'Acqua G, Torres JV & Balaban N (2001) RNAIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. *Peptides* 22(10):1609-1620.
- Govind R, Fitzwater L & Nichols R (2015) Observations on the Role of TcdE Isoforms in *Clostridium difficile* Toxin Secretion. *J Bacteriol* 197(15):2600-2609.
- Grandclement C, Tannieres M, Morera S, Dessaux Y & Faure D (2016) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS microbiology reviews* 40(1):86-116.
- Hamula CL, Peng H, Wang Z, Newbigging AM, Tyrrell GJ, Li XF & Le XC (2015) The Effects of SELEX Conditions on the Resultant Aptamer Pools in the Selection of Aptamers Binding to Bacterial Cells. *J Mol Evol* 81(5-6):194-209.
- He W, Elizondo-Riojas MA, Li X, Lokesh GL, Somasunderam A, Thiviyanathan V, Volk DE, Durland RH, Englehardt J, Cavasotto CN & Gorenstein DG (2012) X-aptamers: a bead-based selection method for random incorporation of druglike moieties onto next-generation aptamers for enhanced binding. *Biochemistry* 51(42):8321-8323.
- Hedge DD, Strain JD, Heins JR & Farver DK (2008) New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI). *Ther Clin Risk Manag* 4(5):949-964.
- Hickson M (2011) Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. *Therap Adv Gastroenterol* 4(3):185-197.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC & Sanders ME (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(8):506-514.
- Hillman ET, Lu H, Yao T & Nakatsu CH (2017) Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and environments* 32(4):300-313.
- Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ & Reisinger EC (1998) Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 27(4):702-710.
- Hookman P & Barkin JS (2009) *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World journal of gastroenterology* 15(13):1554-1580.
- Hua L, Hilliard JJ, Shi Y, Tkaczyk C, Cheng LI, Yu X, Datta V, Ren S, Feng H, Zinsou R, Keller A, O'Day T, Du Q, Cheng L, Damschroder M, Robbie G, Suzich J, Stover CK & Sellman BR (2014) Assessment of an anti-alpha-toxin monoclonal antibody for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2):1108-1117.
- Hui W, Li T, Liu W, Zhou C & Gao F (2019) Fecal microbiota transplantation for treatment of recurrent *C. difficile* infection: An updated randomized controlled trial meta-analysis. *PLoS One* 14(1):e0210016.
- INSPQ IndspdQ- (2015) *Surveillance des diarrhées associées à Clostridium difficile- Bilan entre 1er avril 2014 au 31 mars 2015*. « <https://www.inspq.qc.ca/infectionsnosocomiales/spin-cd/surveillance-2014-2015>
- INSPQ IndspdQ- (2018) *Diarrhées associées au Clostridium difficile- Résultats de surveillance 2017-2018*. <https://www.inspq.qc.ca/infections-nosocomiales/spin/dacd/surveillance-2017-2018>

- Iwasaki A & Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* 5(10):987-995.
- Johanesen PA, Mackin KE, Hutton ML, Awad MM, Larcombe S, Amy JM & Lyras D (2015) Disruption of the Gut Microbiome: Clostridium difficile Infection and the Threat of Antibiotic Resistance. *Genes (Basel)* 6(4):1347-1360.
- Johnson S, Maziade PJ, McFarland LV, Trick W, Donskey C, Currie B, Low DE & Goldstein EJ (2012) Is primary prevention of Clostridium difficile infection possible with specific probiotics? *Int J Infect Dis* 16(11):e786-792.
- Johnston BC, Ma SS, Goldenberg JZ, Thorlund K, Vandvik PO, Loeb M & Guyatt GH (2012) Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 157(12):878-888.
- Juge N (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol* 20(1):30-39.
- Kamada N & Nunez G (2013) Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. *J Immunol* 190(4):1389-1395.
- Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, Khoruts A, Geis E, Maldonado J, McDonough-Means S, Pollard EL, Roux S, Sadowsky MJ, Lipson KS, Sullivan MB, Caporaso JG & Krajmalnik-Brown R (2017) Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 5(1):10.
- Karlsson S, Burman LG & Akerlund T (1999) Suppression of toxin production in Clostridium difficile VPI 10463 by amino acids. *Microbiology* 145 (Pt 7):1683-1693.
- Kazamias MT & Sperry JF (1995) Enhanced fermentation of mannitol and release of cytotoxin by Clostridium difficile in alkaline culture media. *Appl Environ Microbiol* 61(6):2425-2427.
- Kelly CP & LaMont JT (2008) Clostridium difficile--more difficult than ever. *N Engl J Med* 359(18):1932-1940.
- Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, Smeltzer MS & Hurlburt BK (2004) Staphylococcus aureus AgrA binding to the RNAlII-agr regulatory region. *J Bacteriol* 186(22):7549-7555.
- Kotani Y, Shinkai S, Okamatsu H, Toba M, Ogawa K, Yoshida H, Fukaya T, Fujiwara Y, Chaves PH, Kakumoto K & Kohda N (2010) Oral intake of Lactobacillus pentosus strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Immunity & ageing : I & A* 7:11.
- Lahtinen SJ (2012) Probiotic viability - does it matter? *Microb Ecol Health Dis* 23.
- Lai CY, Sung J, Cheng F, Tang W, Wong SH, Chan PKS, Kamm MA, Sung JJY, Kaplan G, Chan FKL & Ng SC (2019) Systematic review with meta-analysis: review of donor features, procedures and outcomes in 168 clinical studies of faecal microbiota transplantation. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 49(4):354-363.
- Lam TI, Tam CC, Stanker LH & Cheng LW (2016) Probiotic Microorganisms Inhibit Epithelial Cell Internalization of Botulinum Neurotoxin Serotype A. *Toxins* 8(12).
- Lawley TD & Walker AW (2013) Intestinal colonization resistance. *Immunology* 138(1):1-11.
- Lebeer S, Vanderleyden J & De Keersmaecker SC (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 8(3):171-184.

- Lee AS & Song KP (2005) LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*. *Biochem Biophys Res Commun* 335(3):659-666.
- Leonard PG, Bezar IF, Sidote DJ & Stock AM (2012) Identification of a hydrophobic cleft in the LytTR domain of AgrA as a locus for small molecule interactions that inhibit DNA binding. *Biochemistry* 51(50):10035-10043.
- Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JI, Phipps EC, Wilson LE, Winston LG, Cohen JA, Limbago BM, Fridkin SK, Gerding DN & McDonald LC (2015) Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *The New England journal of medicine* 372(9):825-834.
- Li J, Wang W, Xu SX, Magarvey NA & McCormick JK (2011) Lactobacillus reuteri-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(8):3360-3365.
- Lilly DM & Stillwell RH (1965) Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* 147(3659):747-748.
- Lindberg BG, Oldenvi S & Steiner H (2014) Medium from gamma-irradiated *Escherichia coli* bacteria stimulates a unique immune response in *Drosophila* cells. *Developmental and comparative immunology* 46(2):392-400.
- Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Beliveau C, Oughton M, Brukner I & Dascal A (2011) Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med* 365(18):1693-1703.
- Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, Nichol G, Thomas WD, Jr., Leney M, Sloan S, Hay CA & Ambrosino DM (2010) Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 362(3):197-205.
- Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK & Wilkins TD (1985) Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 47(2):349-352.
- Lyon GJ, Mayville P, Muir TW & Novick RP (2000) Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(24):13330-13335.
- Ma B, Zhou Y, Li M, Yu Q, Xue X, Li Z, Da F, Hou Z & Luo X (2015) RIP-V improves murine survival in a sepsis model by down-regulating RNAIII expression and alpha-hemolysin release of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Die Pharmazie* 70(2):81-87.
- Martin J & Wilcox M (2016) New and emerging therapies for *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Infect Dis* 29(6):546-554.
- Martin MJ, Clare S, Goulding D, Faulds-Pain A, Barquist L, Browne HP, Pettit L, Dougan G, Lawley TD & Wren BW (2013) The agr locus regulates virulence and colonization genes in *Clostridium difficile* 027. *J Bacteriol* 195(16):3672-3681.
- Martin-Verstraete I, Peltier J & Dupuy B (2016) The Regulatory Networks That Control *Clostridium difficile* Toxin Synthesis. *Toxins* 8(5).
- Matamouros S, England P & Dupuy B (2007) *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* 64(5):1274-1288.

- Maziade PJ, Andriessen JA, Pereira P, Currie B & Goldstein EJ (2013) Impact of adding prophylactic probiotics to a bundle of standard preventative measures for *Clostridium difficile* infections: enhanced and sustained decrease in the incidence and severity of infection at a community hospital. *Current medical research and opinion* 29(10):1341-1347.
- McCollum DL & Rodriguez JM (2012) Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10(6):581-592.
- McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould CV, Kelly C, Loo V, Shaklee Sammons J, Sandora TJ & Wilcox MH (2018) Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 66(7):e1-e48.
- McFarland LV (2006) Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 101(4):812-822.
- McFarland LV (2016) Therapies on the horizon for *Clostridium difficile* infections. *Expert opinion on investigational drugs* 25(5):541-555.
- McFarland LV, Evans CT & Goldstein EJC (2018a) Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in medicine* 5:124.
- McFarland LV, Ozen M, Dinleyici EC & Goh S (2016) Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *World journal of gastroenterology* 22(11):3078-3104.
- McFarland LV, Ship N, Auclair J & Millette M (2018b) Primary prevention of *Clostridium difficile* infections with a specific probiotic combining *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. rhamnosus* strains: assessing the evidence. *The Journal of hospital infection* 99(4):443-452.
- Medellin-Pena MJ & Griffiths MW (2009) Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl Environ Microbiol* 75(4):1165-1172.
- Menard O, Butel MJ, Gaboriau-Routhiau V & Waligora-Dupriet AJ (2008) Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants. *Appl Environ Microbiol* 74(3):660-666.
- Metchnikoff E & Mitchell PC (1908) *The prolongation of life: optimistic studies*. G. P. Putnam's sons, New York & London,. 1 p.l., v -xx p., p
- Meurman JH, Antila H, Korhonen A & Salminen S (1995) Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. *Eur J Oral Sci* 103(4):253-258.
- MH T (1906) Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin. *Compte-rendus de la Société de Biologie* 60:359-361.
- Miller MB & Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-199.
- Naaber P, Smidt I, Stsepetova J, Brilene T, Annuk H & Mikelsaar M (2004) Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. *J Med Microbiol* 53(Pt 6):551-554.

- Najarian A, Sharif S & Griffiths MW (2018) Evaluation of protective effect of *Lactobacillus acidophilus* La-5 on toxicity and colonization of *Clostridium difficile* in human epithelial cells in vitro. *Anaerobe* 55:142-151.
- Nakayama J, Uemura Y, Nishiguchi K, Yoshimura N, Igarashi Y & Sonomoto K (2009) Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quorumones in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2):580-586.
- Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, Naidu N, Choudhury B, Weimer BC, Monack DM & Sonnenburg JL (2013) Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502(7469):96-99.
- O'Brien JA, Lahue BJ, Caro JJ & Davidson DM (2007) The emerging infectious challenge of *clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28(11):1219-1227.
- O'Hara AM & Shanahan F (2007) Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *ScientificWorldJournal* 7:31-46.
- Oelschlaeger TA (2010) Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol* 300(1):57-62.
- Ohland CL & Macnaughton WK (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298(6):G807-819.
- Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, Moltzau-Anderson J, Bharti R, Grasis JA, Cassidy L, Tholey A, Fickenscher H, Seegert D, Rosenstiel P & Schreiber S (2017) Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology* 152(4):799-811 e797.
- Park J, Jagasia R, Kaufmann GF, Mathison JC, Ruiz DI, Moss JA, Meijler MM, Ulevitch RJ & Janda KD (2007) Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chemistry & biology* 14(10):1119-1127.
- Park SY, Hwang BJ, Shin MH, Kim JA, Kim HK & Lee JK (2006) N-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiol Lett* 261(1):102-108.
- Park SY, Kang HO, Jang HS, Lee JK, Koo BT & Yum DY (2005) Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* 71(5):2632-2641.
- Pechine S, Janoir C, Boureau H, Gleizes A, Tsapis N, Hoys S, Fattal E & Collignon A (2007) Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. *Vaccine* 25(20):3946-3954.
- Peniche AG, Savidge TC & Dann SM (2013) Recent insights into *Clostridium difficile* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* 26(5):447-453.
- Pereira CS, Thompson JA & Xavier KB (2013) AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 37(2):156-181.
- Perez-Cobas AE, Moya A, Gosalbes MJ & Latorre A (2015) Colonization Resistance of the Gut Microbiota against *Clostridium difficile*. *Antibiotics (Basel)* 4(3):337-357.

- Peterson MM, Mack JL, Hall PR, Alsup AA, Alexander SM, Sully EK, Sawires YS, Cheung AL, Otto M & Gresham HD (2008) Apolipoprotein B Is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe* 4(6):555-566.
- Pothoulakis C, Castagliuolo I & LaMont JT (1998) Nerves and Intestinal Mast Cells Modulate Responses to Enterotoxins. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 13:58-63.
- Pozzoni P, Riva A, Bellatorre AG, Amigoni M, Redaelli E, Ronchetti A, Stefani M, Tironi R, Molteni EE, Conte D, Casazza G & Colli A (2012) *Saccharomyces boulardii* for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult hospitalized patients: a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol* 107(6):922-931.
- Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, Moore D, Price M, Sharma N & Iqbal TH (2017) Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 46(5):479-493.
- Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A & Novick RP (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 202(1):58-61.
- Rodriguez C, Van Broeck J, Taminiau B, Delmee M & Daube G (2016) *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial pathogenesis* 97:59-78.
- Rouphael NG, O'Donnell JA, Bhatnagar J, Lewis F, Polgreen PM, Beekmann S, Guarner J, Killgore GE, Coffman B, Campbell J, Zaki SR & McDonald LC (2008) *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology* 198(6):635 e631-636.
- Roy V, Fernandes R, Tsao CY & Bentley WE (2010) Cross species quorum quenching using a native AI-2 processing enzyme. *ACS chemical biology* 5(2):223-232.
- Salkind AR (2010) *Clostridium difficile*: an update for the primary care clinician. *Southern medical journal* 103(9):896-902.
- Sampalis J, Psaradellis E & Rampakakis E (2010) Efficacy of BIO K+ CL1285 in the reduction of antibiotic-associated diarrhea - a placebo controlled double-blind randomized, multi-center study. *Arch Med Sci* 6(1):56-64.
- Savidge TC, Pan WH, Newman P, O'Brien M, Anton PM & Pothoulakis C (2003) *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* 125(2):413-420.
- Seekatz AM, Theriot CM, Rao K, Chang YM, Freeman AE, Kao JY & Young VB (2018) Restoration of short chain fatty acid and bile acid metabolism following fecal microbiota transplantation in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 53:64-73.
- Sender R, Fuchs S & Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14(8):e1002533.
- Shea KW & Cunha BA (1995) Teicoplanin. *The Medical clinics of North America* 79(4):833-844.

- Shen A (2015) A Gut Odyssey: The Impact of the Microbiota on *Clostridium difficile* Spore Formation and Germination. *PLoS Pathog* 11(10):e1005157.
- Silva M, Jacobus NV, Deneke C & Gorbach SL (1987) Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 31(8):1231-1233.
- Sio CF, Otten LG, Cool RH, Diggle SP, Braun PG, Bos R, Daykin M, Camara M, Williams P & Quax WJ (2006) Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* 74(3):1673-1682.
- Sniffen JC, McFarland LV, Evans CT & Goldstein EJC (2018) Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidence-based practical guide. *PloS one* 13(12):e0209205.
- Solbach P, Chhatwal P, Woltemate S, Tacconelli E, Buhl M, Gerhard M, Thoeringer CK, Vehreschild M, Jazmati N, Rupp J, Manns MP, Bachmann O & Suerbaum S (2018) BaiCD gene cluster abundance is negatively correlated with *Clostridium difficile* infection. *PLoS One* 13(5):e0196977.
- Spinler JK, Auchtung J, Brown A, Boonma P, Oezguen N, Ross CL, Luna RA, Runge J, Versalovic J, Peniche A, Dann SM, Britton RA, Haag A & Savidge TC (2017) Next-Generation Probiotics Targeting *Clostridium difficile* through Precursor-Directed Antimicrobial Biosynthesis. *Infect Immun* 85(10).
- Stabler RA, He M, Dawson L, Martin M, Valiente E, Corton C, Lawley TD, Sebahia M, Quail MA, Rose G, Gerding DN, Gibert M, Popoff MR, Parkhill J, Dougan G & Wren BW (2009) Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol* 10(9):R102.
- Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, Zur M, Regev-Lehavi D, Ben-Zeev Brik R, Federici S, Horn M, Cohen Y, Moor AE, Zeevi D, Korem T, Kotler E, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Pevsner-Fischer M, Shapiro H, Sharon I, Halpern Z, Segal E & Elinav E (2018) Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* 174(6):1406-1423 e1416.
- Sully EK, Malachowa N, Elmore BO, Alexander SM, Femling JK, Gray BM, DeLeo FR, Otto M, Cheung AL, Edwards BS, Sklar LA, Horswill AR, Hall PR & Gresham HD (2014) Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PLoS Pathog* 10(6):e1004174.
- Surawicz CM (2007) Antibiotics and *Clostridium difficile*: cause and cure. *J Clin Gastroenterol* 41(1):1-2.
- Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, Garcia RJ, Brandmarker S, Bowen K, Borjal D & Elmer GW (2000) The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis* 31(4):1012-1017.
- Surette MG, Miller MB & Bassler BL (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1639-1644.
- Tan KS, Wee BY & Song KP (2001) Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 50(7):613-619.
- Tan L, Li SR, Jiang B, Hu XM & Li S (2018) Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (agr) System. *Front Microbiol* 9:55.

- Tang K & Zhang XH (2014) Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. *Mar Drugs* 12(6):3245-3282.
- Taur Y & Pamer EG (2014) Harnessing microbiota to kill a pathogen: Fixing the microbiota to treat *Clostridium difficile* infections. *Nature medicine* 20(3):246-247.
- Tegmark K, Morfeldt E & Arvidson S (1998) Regulation of agr-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative staphylococci. *J Bacteriol* 180(12):3181-3186.
- Tejero-Sarinena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR & Rowland I (2012) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe* 18(5):530-538.
- Tuomola EM, Ouwehand AC & Salminen SJ (2000) Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International journal of food microbiology* 60(1):75-81.
- Utari PD, Vogel J & Quax WJ (2017) Deciphering Physiological Functions of AHL Quorum Quenching Acylases. *Front Microbiol* 8:1123.
- Valdez JC, Peral MC, Rachid M, Santana M & Perdigon G (2005) Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11(6):472-479.
- van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP & Aarts HJ (2011) Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2:203.
- van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG & Keller JJ (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 368(5):407-415.
- Wang B & Muir TW (2016) Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell chemical biology* 23(2):214-224.
- Wasfi R, Abd El-Rahman OA, Zafer MM & Ashour HM (2018) Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of cellular and molecular medicine* 22(3):1972-1983.
- White R, Chiba S, Pang T, Dewey JS, Savva CG, Holzenburg A, Pogliano K & Young R (2011) Holin triggering in real time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2):798-803.
- Willing BP, Russell SL & Finlay BB (2011) Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol* 9(4):233-243.
- Xing P, Shi Y, Dong C, Liu H, Cheng Y, Sun J, Li D, Li M, Sun K & Feng D (2017) Colon-Targeted Delivery of IgY Against *Clostridium difficile* Toxin A and B by Encapsulation in Chitosan-Ca Pectinate Microbeads. *AAPS PharmSciTech* 18(4):1095-1103.
- Yong CC, Lim J, Kim BK, Park DJ & Oh S (2019) Suppressive effect of *Lactobacillus fermentum* Lim2 on *Clostridioides difficile* 027 toxin production. *Letters in applied microbiology* 68(5):386-393.
- Yun B, Oh S & Griffiths MW (2014) *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. *J Dairy Sci* 97(8):4745-4758.

- Yun B, Oh S, Song M, Hong YS, Park S, Park DJ, Griffiths MW & Oh S (2015) Inhibitory Effect of Epigallocatechin Gallate on the Virulence of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027. *Journal of food science* 80(12):M2925-2931.
- Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM & Davis MB (2007) A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis* 45(3):302-307.
- Zhang JJ (2012) *Clostridium difficile* Transcriptomics and Metronidazole Resistance. Master of Science (The University of Manitoba Winnipeg, Manitoba, Canada). 170 p
- Zhang Y, Wang JF, Dong J, Wei JY, Wang YN, Dai XH, Wang X, Luo MJ, Tan W, Deng XM & Niu XD (2013) Inhibition of alpha-toxin production by subinhibitory concentrations of naringenin controls *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Fitoterapia* 86:92-99.
- Zhou S, Zhang A, Yin H & Chu W (2016a) *Bacillus* sp. QSI-1 Modulate Quorum Sensing Signals Reduce *Aeromonas hydrophila* Level and Alter Gut Microbial Community Structure in Fish. *Front Cell Infect Microbiol* 6:184.
- Zhou Y, Zhao R, Ma B, Gao H, Xue X, Qu D, Li M, Meng J, Luo X & Hou Z (2016b) Oligomerization of RNAIII-Inhibiting Peptide Inhibits Adherence and Biofilm Formation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo. *Microb Drug Resist* 22(3):193-201.
- Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashirdes S, Kotler E, Zur M, Regev-Lehavi D, Brik RB, Federici S, Cohen Y, Linevsky R, Rothschild D, Moor AE, Ben-Moshe S, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Shapiro H, Pevsner-Fischer M, Sharon I, Halpern Z, Segal E & Elinav E (2018) Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* 174(6):1388-1405 e1321.

8 BIBLIOGRAPHIE

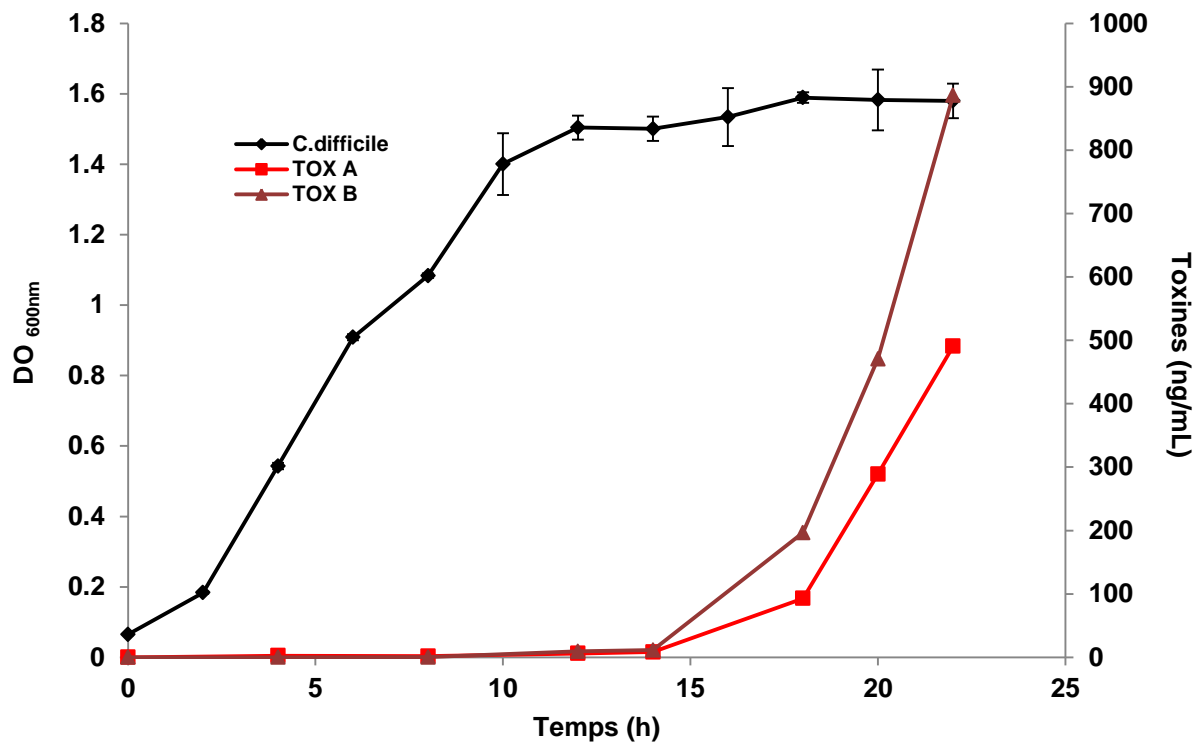


Figure 9. Cinétique de croissance de *C. difficile* R20291 dans le milieu TY et la production de toxines A et B mesurées dans le temps incubé à 37°C, anaérobie