

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

**ELUCIDATION DES MECANISMES D'ACTION ANTI-C. DIFFICILE
PAR LES SOUCHES PROBIOTIQUES *LACTOBACILLUS
ACIDOPHILUS* CL1285, *LACTICASEIBACILLUS CASEI* LBC80R et
LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS CLR2**

Par
Zoé Masset

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

Jury d'évaluation

Président du jury

Étienne Yergeau, *Ph.D.*
INRS-Centre Armand Frappier
Santé Biotechnologie

Examineur interne

Étienne Yergeau, *Ph.D.*
INRS-Centre Armand Frappier
Santé Biotechnologie

Examineur externe

George Szatmari, *Ph.D.*
Département de microbiologie,
Infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Directeur de recherche

Monique Lacroix, *Ph.D.*
INRS-Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

Codirecteur de recherche

Mathieu Millette, *Ph.D.*
Bio-K Plus International
Inc., une compagnie Kerry

Je dédie ce mémoire à Marie-Thérèse et Pascal Masset, mes parents, qui me soutiennent quotidiennement avec amour et bienveillance depuis toujours. Qu'ils trouvent dans ces travaux l'aboutissement de leurs propres efforts et mon éternelle gratitude, merci pour tout.

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je voudrais remercier Professeure Monique Lacroix de m'avoir accueillie dans son laboratoire et soutenue afin de pouvoir compléter ma maîtrise de microbiologie appliquée. J'aimerais également remercier mon co-directeur de recherche Monsieur Mathieu Millette, Il a été un très bon encadrant durant ma maîtrise, engagé et généreux, sachant toujours me donner les bons conseils et m'encourager dans mes travaux.

Merci vivement à l'ensemble des membres du jury : Monsieur Étienne Yergeau, *Ph.D.*, Monsieur George Szatmari, *Ph.D.*, Madame Monique Lacroix, *Ph.D.* et Monsieur Mathieu Millette, *Ph.D.* pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

Grandement merci à Madame Sathursha Gunaratnam, chargée de projet chez Bio-K+ de m'avoir formé aux nouvelles techniques de laboratoire et d'avoir partagé ses précieuses connaissances. J'aimerais également remercier Monsieur Samir Bouasker, scientifique de recherche chez Bio-K+ pour sa disponibilité et ses conseils qui ont été très formateurs. Merci à toute l'équipe de recherche préclinique de Bio-K+, mesdames Julie Auclair et Myriam Coutu ainsi que Monsieur Martin Frappier pour leur soutien, leurs conseils et leur bienveillance tout au long de ma maîtrise.

Merci vivement à Monsieur Stéphane Salmieri, assistant de recherche au sein du laboratoire de Professeure Lacroix, toujours bienveillant et disponible pour chacun des étudiants. J'aimerais remercier l'ensemble des étudiants du laboratoire de Professeure Lacroix pour leur soutien et leurs conseils. Merci à l'INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, mais particulièrement au Professeur Phillippe Constant qui m'a toujours accueilli pour répondre à toutes mes interrogations.

Merci à Bio-K Plus International, une compagnie Kerry de m'avoir accueillie au sein de leur entreprise. Je remercie également le CRSNG et Mitacs qui m'ont permis de bénéficier d'un support financier essentiel à l'accomplissement de mon projet.

Enfin, j'aimerais tout particulièrement remercier mon compagnon Éric pour son amour et ses encouragements au quotidien, ma sœur Léa, ma tante Sylvie et l'ensemble de ma famille pour leur soutien.

RÉSUMÉ

Les infections à *C. difficile* (ICD) sont une importante cause de morbidité et de mortalité chez les patients hospitalisés. La formule probiotique contenant les souches *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2, aide à réduire l'incidence des ICD et des diarrhées associées aux antibiotiques (DAA). Malgré son efficacité clinique démontrée pour la prévention des ICD, les mécanismes sous-jacents de cet effet prophylactique sont méconnus. Des travaux antérieurs ont démontré que ces souches probiotiques inhibent la croissance et la sécrétion des toxines A et B de *C. difficile* (CD) en co-culture par des mécanismes dépendants et indépendants de l'acidification du milieu. L'acidification étant un mécanisme général d'inhibition pour la croissance des bactéries, l'objectif de ce projet vise à élucider les mécanismes d'action indépendants de l'acidification du milieu pouvant ainsi expliquer l'effet protecteur démontré lors des études cliniques. Pour ce faire, l'activité anti-toxine a été confirmée dans des essais de co-culture en fermenteur permettant un contrôle précis du pH. Ensuite, l'expression de l'ensemble des gènes de CD a été évaluée entre des monocultures et des co-cultures de CD avec les souches probiotiques par transcriptomique. Enfin, la modulation de l'expression des gènes observée lors des essais de transcriptomique a été confirmée par RT-qPCR. Les résultats de fermentation ont démontré une diminution de la toxine A de 47% dans les co-cultures de CD avec les probiotiques, mais pas de diminution significative pour la toxine B ni d'inhibition de la croissance. Les résultats de l'étude transcriptomique n'ont pas démontré de sur ou sous-expression des gènes codants pour les toxines A et B. Cependant, d'autres gènes liés à la motilité, l'adhérence, à la production de biofilm, tous impliqués dans la virulence de CD, ont été sous-exprimés.

Mots clés : probiotiques; *Clostridioides difficile*; *Lactobacillus*; infections à *C. difficile*; *L. acidophilus* CL1285; *L. casei* LBC80R; *L. rhamnosus* CLR2; microbiote; dysbiose; expression de gènes

ABSTRACT

C. difficile infections (Khanafer *et al.*) are a major cause of morbidity and mortality in hospitalized patients. The probiotic formulation comprised of *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 strains help to reduce the incidence of CDI and antibiotic-associated diarrhea (AAD). Despite its clinical efficacy for the prevention of CDI, the underlying mechanisms of this therapeutic effect are not well understood. Previous works have shown that these probiotic strains inhibit the growth of *C. difficile* (CD) and secretion of its toxins A and B by two mechanisms; one relying on acidification and the other not. The objective of this project was therefore to elucidate the mechanism of action, independent of the acidification of the environment. To do this, the anti-toxin activity was confirmed in co-culture assays conducted in a bioreactor allowing precise control of the pH. Then, the expression of CD genes was evaluated between monocultures and co-cultures of CD with the probiotic strains using transcriptomics. Then, the modulation of gene expression revealed by transcriptomic assays were confirmed by RT-qPCR. Fermentation results demonstrated a 47% decrease for the toxin A in CD co-cultures with probiotics, but no significant decrease of the toxin B nor growth inhibition. The results of the transcriptomic study did not demonstrate over or under expression of the genes encoding toxins A and B. However, many other genes related to motility, adhesion, biofilm production, involved in CD virulence have been repressed by the presence of the probiotic strains.

Keywords : probiotics; *Clostridioides difficile*; *Lactobacillus*; *C. difficile* infections; *L. acidophilus* CL1285; *L. casei* LBC80R; *L. rhamnosus* CLR2; microbiota; dysbiosis; gene expression

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
I. INTRODUCTION	XV
I. La bactérie <i>Clostridioides difficile</i> (<i>C. difficile</i>)	2
1. Généralités sur <i>C. difficile</i>	2
1.1 Historique.....	2
1.2 Caractéristique de la bactérie <i>C. difficile</i>	2
1.3 Épidémiologie	3
1.4 Pathogénèse de <i>C. difficile</i>	3
1.4.1 Mécanismes de colonisation	3
1.4.2 Mécanismes de virulence	4
1.5 Facteurs de virulence	5
1.5.1 <i>Toxines</i>	5
1.5.2 Sporulation.....	9
1.5.3 Protéines flagellaires	10
1.5.4 Autres facteurs de virulence	11
1.6 Les protéines chaperons	12
1.7 Manifestations cliniques	14
2. Les facteurs de risques	15
2.1 Facteurs liés à l'hôte.....	15
2.1.1 Les antibiothérapies	15
2.1.2 <i>L'âge</i>	16
2.1.3 Les chimiothérapies.....	16
2.1.4 Les inhibiteurs de pompe à protons	17
2.2 Facteurs liés à l'environnement.....	18
2.2.1 Les hospitalisations	18
2.2.2 Les transplantations d'organes	19
3. Les traitements	20
3.1 Les antibiotiques.....	20
3.2 Les chirurgies	21
3.3 La transplantation fécale	21
3.4 Les anticorps monoclonaux	23

4. Spécificités génétiques des souches 027	23
4.1 Souche épidémique NAP1/BI/027	23
4.2 Spécificités génétiques des souches 027	24
II. Les probiotiques	25
1. Généralités sur les probiotiques	25
1.1 Historique.....	25
1.2 Caractéristique des probiotiques	25
1.3 Intérêts des probiotiques	27
1.4 Les probiotiques efficaces dans la prévention des ICD	29
III. But, hypothèses et objectifs	31
II. Matériel et méthodes	36
Objectif 1 : Confirmation de l'effet anti-toxines des souches probiotiques	36
1. Souches bactériennes	36
2. Croissance bactériennes	36
2.1 Cultures bactériennes	36
2.2 Détermination des concentrations bactériennes	37
3. Configuration des essais de fermentation	38
3.1 Normes de biosécurité.....	38
3.2 Transport des échantillons	38
3.3 Anaérobie de la cuve.....	39
3.4 Le système d'agitation.....	39
3.5 Le pH	39
3.6 Le contrôle de la température.....	39
3.7 La sonde de dioxygène dissout (OD)	40
3.8 Le système d'échappement.....	40
3.9 Le logiciel de supervision	40
4. Quantification sur gélose	40
4.1 Bactéries.....	40
4.2 Spores	41
5. Quantification des toxines A et B.....	41
6. Analyse statistiques cultures bactériennes	42

Objectif 2 : Analyse transcriptomique de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 en présence de souches probiotiques	43
1. Optimisation de l'extraction de l'ARN de <i>C. difficile</i>	43
2. Traitement Turbo DNA-free kit sur des échantillons d'ARN	45
3. Évaluation de la quantité et de la qualité de l'ARN avec le Nanodrop	46
4. Visualisation de l'ARN par électrophorèse sur gel d'agarose	46
5. Transcription inverse des échantillons d'ARN en ADNc	46
6. Vérifier l'amplification des échantillons d'ADNc de <i>C. difficile</i> issus du fermenteur à l'aide des amorces des gènes <i>tcdA</i> et <i>tcdB</i> par PCR	48
7. Visualisation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	49
8. Étude transcriptomique.....	49
9. Analyse bio-informatique	50
10. Analyse statistiques étude transcriptomique	51
Objectif 3 : Confirmation par RT-qPCR de la modulation de l'expression des gènes observée lors des essais de transcriptomique	52
1. Extraction de l'ADN génomique de <i>C. difficile</i> pour la spécificité	52
2. Analyse PCR quantitative de <i>C. difficile</i> R20291	52
2.1 Conception des amorces	52
2.2 Optimisation des amorces	53
2.2.1 Gradient de température	53
2.2.2 Spécificité	55
2.2.3 Stabilité	56
2.2.4 Efficacité	56
3. Analyse bio-informatique	57
III. Résultats	59
Objectif 1 : Confirmation de l'effet anti-toxines des souches probiotiques	59
1. Validation des cycles de stérilisation	59
1.1 Croissance bactérienne.....	59
1.2 Croissance spores	59
2. Croissance bactérienne en fermenteur	60
3. Production de toxines A et B	61
Objectif 2 : Analyse transcriptomique de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 en présence de souches probiotiques	63
1. Expression des gènes de toxines.....	63
2. Modulation de l'ensemble des gènes de <i>C. difficile</i> R20291.....	64
2.1 Résultats d'expression des gènes de l'étude transcriptomique	70
2.1.1 <i>Toxines</i>	70

2.1.2 <i>Motilité</i>	71
2.1.3 <i>Sporulation</i>	72
2.1.4 Protéines liées au QS	73
2.1.5 Protéines d'adhésion	74
2.1.6 Protéines chaperonnes.....	74
2.1.7 Systèmes de transport	75
2.1.8 Autres protéines	75
Objectif 3 : Confirmation par RT-qPCR de la modulation de l'expression des gènes observée lors des essais de transcriptomique	76
1. Optimisation des amorces	76
1.1 Gradients de température.....	76
1.2 Spécificité	76
1.3 Stabilité	76
1.4 Efficacité	76
2. Validation des amorces par électrophorèse	79
3. Confirmation des résultats de l'étude transcriptomique par RT-qPCR	80
IV. Discussion	83
Objectif 1 : Confirmation de l'effet anti-toxines des souches probiotiques	83
Objectif 2 : Analyse transcriptomique de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 en présence de souches probiotiques	89
Objectif 3 : Confirmation par RT-qPCR la modulation de l'expression des gènes observée lors des essais de transcriptomique.	97
1. RT-qPCR et optimisation des gènes de référence.....	97
2. Flagelles et motilité.....	97
Conclusion	100
Annexes.....	103
Références	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèle schématique montrant les gènes majeurs présents dans le locus de pathogénicité (PaLoC) de <i>C. difficile</i> ainsi que les gènes codant pour la toxine binaire non présents sur le PaLoC (McDonald <i>et al.</i> , 2005).....	7
Figure 2 : Modèle schématique montrant les mécanismes d'action des toxines de <i>C. difficile</i> dans les cellules épithéliales (Abt <i>et al.</i> , 2016).....	8
Figure 3 : Modèle schématique montrant les étapes de sporulation et germination de <i>C. difficile</i> (Abt <i>et al.</i> , 2016)	10
Figure 4 : Modèle schématique montrant l'implication des protéines chaperons au cours de la synthèse, du repliement, de l'agrégation et de la dégradation des protéines (Balchin <i>et al.</i> , 2016).....	14
Figure 5 : Modèle schématique montrant la perturbation d'un microbiote gastro-intestinal sain par les antibiotiques (Spinler <i>et al.</i> , 2016).....	28
Figure 6 : Suivi de la croissance de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 en fermenteur, cultivé seul et en présence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R et <i>L. rhamnosus</i> CLR2 dans un milieu BHI avec contrôle du pH.....	60
Figure 7 : Suivi de la croissance de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R et <i>L. rhamnosus</i> en fermenteur, cultivés seuls et en présence de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 dans un milieu BHI avec contrôle du pH.....	61
Figure 8 : Suivi de la sécrétion des toxines A et B exprimé en ng/UFC après 24 h dans un bioréacteur inoculé avec <i>Clostridioides difficile</i> R20291 avec ou sans <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R et <i>L. rhamnosus</i> CLR2 dans un milieu BHI avec contrôle du pH	62
Figure 9 : Visualisation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADNc traité à la Dnase de <i>Clostridioides difficile</i> R20290 (CD) cultivé seul et en co-culture avec <i>L. acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R et <i>L. rhamnosus</i> CLR2 (LB)	63
Figure 10 : Visualisation après migration par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant, de l'extraction d'ARN des échantillons des cultures de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 seul (A, B, C), des co-cultures de <i>C. difficile</i> et de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R, <i>L. rhamnosus</i> CLR2 (D, E, F) et des co-cultures des Lactobacilles seuls (G, H, I) après 12 h en milieu BHI.....	66
Figure 11 : Chromatogramme représentatif de la qualité des échantillons de l'ARN extrait de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 cultivé seul pendant 12 h dans un fermenteur à 37 ° C dans un milieu BHI analysé avec un bioanalyser	67
Figure 12 : Chromatogramme représentatif de la qualité des échantillons de l'ARN extrait de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 cultivé en présence des souches probiotiques <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R, <i>L. rhamnosus</i> CLR2 pendant 12 h en fermenteur à 37 °C dans un milieu BHI analysé avec un bioanalyser.....	67

Figure 13 : Diagramme en tarte représentant les onze différentes catégories regroupant l'ensemble des gènes de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 dont l'expression a été modulée en fermenteur dans un milieu BHI après 12 h en présence des souches probiotiques <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R, <i>L. rhamnosus</i> CLR2.....	68
Figure 14 : Diagramme de Kegg représentant les onze différentes catégories regroupant le nombre des gènes de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 dont l'expression a été sur ou sous exprimée au moins 4 fois en présence des souches de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R, <i>L. rhamnosus</i> CLR2 en fermenteur après 12 h dans un milieu BHI.....	69
Figure 15 : Diagramme en barres représentant les niveaux d'expression des gènes liés à la sporulation de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 en co-culture avec <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R and <i>L. rhamnosus</i> CLR2.....	73
Figure 16 : Exemple de courbe d'amplification RT-qPCR pour le gène <i>fliC</i> utilisant des dilutions de facteur de 10 de l'ADNc de <i>Clostridioides difficile</i> R20291.....	78
Figure 17 : Exemple de courbe standard RT-qPCR pour le gène <i>fliC</i> utilisant des dilutions de facteur de 10 de l'ADNc de <i>Clostridioides difficile</i> R20291.....	78
Figure 18 : Exemple de courbe de fusion RT-qPCR pour le gène <i>fliC</i> en utilisant des dilutions de facteur de 10 de l'ADNc de <i>Clostridioides difficile</i> R20291.....	79
Figure 19 : Confirmation par RT-qPCR de l'expression des gènes liés à la motilité de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 en co-culture avec <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R and <i>L. rhamnosus</i> CLR2 par rapport aux monocultures.....	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Risques relatifs des ICD liés à l'antibiothérapie (Buyse <i>et al.</i> , 2005).....	16
Tableau 2 : Composants de la réaction d'élimination de l'ADN génomique.....	47
Tableau 3 : Composants de réaction de la transcription inverse.....	47
Tableau 4 : Eléments de préparation des mastermix pour PCR avec les amorces des gènes <i>tcdA</i> et <i>tcdB</i> sur de l'ADN extrait de <i>C. difficile</i> R20291.....	48
Tableau 5 : Cycles de PCR à effectuer.....	48
Tableau 6 : Amorces ciblant les gènes <i>tcdA</i> et <i>tcdB</i> de <i>C. difficile</i> R20291.....	49
Tableau 7 : Composants des réactions qPCR.....	53
Tableau 8 : Exemple de disposition des plaques pour le gradient de température des amorces ciblant le gène <i>FliC</i> de <i>Clostridioides difficile</i>	54
Tableau 9 : Paramètres qPCR pour les gradients de température.....	54
Tableau 10 : Exemple de disposition des plaques des essais de spécificité des amorces de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 avec <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285, <i>L. casei</i> LBC80R, <i>L. rhamnosus</i> CLR2.....	55
Tableau 11 : Exemple de dilutions de l'ADNc des essais d'efficacité des amorces de <i>Clostridioides difficile</i> R20291.....	57
Tableau 12 : Données des courbes standards pour tous les gènes de <i>Clostridioides difficile</i> R20291 étudiés par RT-qPCR dans ce chapitre.....	77
Tableau 13 : Amorces provenant de la compagnie Integrated DNA technologies IDT ciblant les gènes de référence et les gènes de virulence de <i>C. difficile</i> utilisées dans les essais d'expression de gène.....	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
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
ELISA : *Enzyme linked Immunosorbent Assay*
DEGs : Gènes différentiellement exprimés
ICD : Infection à *Clostridioides difficile*
INSPQ : Institut national de santé publique du Québec
IPP : Inhibiteurs des pompes à protons
MHBCA-TAG : *Mueller-Hinton broth cation adjusted, taurocholic acid, glycine*
mL : Millilitre
mm : Millimètre
MRS : de Man, Rogosa, Sharpe
nm : Nanomètre
NaOH : Hydroxyde de sodium
PaLoc : locus de pathogénicité
PBS : "*Phosphate buffered saline*"
pH : Potentiel hydrogène
RCM : *Reinforced Clostridial Medium*
RIN : *RNA Integrity Number*
RT-qPCR : *Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction*
TBE : Tris/Borate/EDTA
UFC : Unité formatrice de colonies
µL : Microlitre
µM : Micromètre

Première partie

Introduction

I. Introduction

I. La bactérie *Clostridioides difficile* (*C. difficile*)

1. Généralités sur *C. difficile*

1.1 Historique

La première description de diarrhées associées à *C. difficile* (DACD) a été décrite à l'Université de Johns Hopkins en 1892. La patiente alors âgée de 22 ans venait de subir une opération digestive par le Docteur William Osler et développa, peu après l'opération, une diarrhée qui entraîna sa mort. L'examen post mortem de l'intestin grêle de la patiente présentera les principales caractéristiques des DACD (Napolitano & Edmiston Jr, 2017). Il faut attendre 1935 pour que *C. difficile* soit isolé par Hall et O'Toole (1935)(Hall & O'toole, 1935) des selles d'un nouveau-né. Dans un premier temps, la bactérie fut identifiée comme non pathogène pour l'humain, mais entraînant des diarrhées chez les cochons et les lapins. Après l'introduction des antibiotiques à la fin des années 1940, de nombreux cas de colites pseudomembraneuses (CPM) ont été documentées, mais la bactérie mise en cause à l'époque fut *Staphylococcus aureus* (Clabots *et al.*, 1992). Il faut attendre que Laron et Bartlett (1978) fassent le lien entre les CPM et la bactérie *C. difficile*. *C. difficile* fut d'abord nommé *Bacillus difficile* (Abt *et al.*, 2016) en raison de sa croissance lente en laboratoire, puis renommée *Clostridium difficile* en raison de sa morphologie, sa capacité à sporuler et son métabolisme anaérobie. Suite à des analyses phénotypiques, chimiotaxonomiques et phylogénétiques, *C. difficile* fut renommé *Clostridioides difficile* en 2016 (Lawson *et al.*, 2016).

1.2 Caractéristique de la bactérie *C. difficile*

C. difficile, est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, qui sécrète des toxines et est capable de produire des spores. Sa forme sporulée permet à la bactérie de persister dans l'environnement et sur les surfaces. *C. difficile* est une des grandes responsables d'infections associées aux antibiotiques en milieu hospitalier et en communauté. On estime qu'entre 2 et 5% des adultes en bonne santé sont porteurs de *C. difficile* (Sammons *et al.*, 2013). *C. difficile* colonise l'intestin de son hôte lorsque le microbiote intestinal est perturbé. L'infection se manifeste alors par des diarrhées légères à sévères qui peuvent être accompagnée de fièvre, nausées et douleurs abdominales. Lorsque l'infection s'intensifie, elle provoque des colites pseudomembraneuses et des perforations du côlon et peut ainsi conduire à la mort (Rupnik *et al.*, 2009). En laboratoire, sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C.

Les colonies mesurent entre 5-10 mm de diamètre, sont mates et présentent des contours irréguliers. L'odeur du crottin de cheval est caractéristique de cette bactérie dû à l'émission de crésol (Rupnik *et al.*, 2009).

1.3 Epidémiologie

Au début de l'année 2021, L'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) a publié un rapport de surveillance des infections à *C. difficile* (ICD) en 2018 et 2019. Entre le 1er avril 2018 et le 31 mars 2019, 87 installations de soins de courte durée ont participé à la surveillance des ICD, ces installations ont rapporté 1 741 ICD. Le taux d'incidence des ICD nosocomiales est de 3,70 par 10 000 jours-présence. Ce taux d'incidence est en baisse pour une quatrième année consécutive et cette baisse est statistiquement significative par rapport au taux d'incidence de 2017-2018. La proportion de décès à 10 jours est de 6,8 % (n = 112) et celle à 30 jours, de 12,0 % (n = 197) (INSPQ, 2021). Selon le rapport de 2015 de l'INSPQ, le système de santé canadien dépenserait plus de 51 millions de dollars par année en frais directs pour gérer les ICD (INSPQ, 2015). Aux États-Unis, le *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) a publié un rapport en 2019, qui indique que pour l'année 2017 le nombre d'hospitalisations était de 223 900, le nombre de décès de 12 800 et les dépenses de santé reliées à la gestion des ICD s'élevait à 1 milliard de dollars (CDC, 2019) .

1.4 Pathogenèse de *C. difficile*

1.4.1 Mécanisme de colonisation

Le colon humain est un environnement anoxique ou de nombreux micro-organismes cohabitent. Par contre, il arrive parfois à la suite d'antibiothérapie que cet équilibre intestinal soit altéré. Cette altération du microbiote intestinal entraîne une dysbiose et une diminution de la résistance aux pathogènes (Poutanen & Simor, 2004). Dans un microbiote intestinal moins riche, les pathogènes tels que *C. difficile* prolifèrent et génèrent une inflammation en altérant l'épithélium intestinal via la production de toxines. Lorsque les individus sont porteurs de la bactérie, l'infection est d'origine endogène. En revanche, si l'infection est causée par une contamination par voie orale-fécale, l'infection est exogène. Les infections exogènes sont largement observées en milieux hospitaliers où le personnel véhicule involontairement les spores entre les patients (Peniche *et al.*, 2013). Lors de la contamination, des cellules sous forme végétatives et des spores vont être acheminées vers l'estomac, l'acidité gastrique va détruire 99% des cellules végétatives et seulement 1% des cellules vont être acheminées jusqu'à l'intestin grêle (Poutanen & Simor, 2004).

Les spores résistent à l'acidité de l'estomac, transitent jusqu'à l'intestin grêle où l'exposition aux acides biliaires primaires, tel que le taurocholate, leur permet de germer et se transformer en cellules végétatives. La spore porte en surface des récepteurs CspC. Lorsque le taurocholate se lie au récepteur, CspB est recruté et amorce l'activation d'une enzyme appelée SleC qui va permettre à la spore de dégrader son cortex et de devenir une cellule végétative capable de coloniser la première partie du gros intestin, appelé caecum, puis proliférer (Peniche *et al.*, 2013). Le microbiote intestinal est responsable d'une partie de la conversion des sels biliaires primaires en sels biliaires secondaires. Les sels biliaires secondaires permettent l'inhibition de la croissance des cellules végétatives de *C. difficile*. Lorsqu'il y a une dysbiose, le manque de conversion des sels biliaires va induire une croissance et une colonisation de *C. difficile* chez l'individu. Les cellules peuvent ensuite pénétrer la couche de mucus intestinal et libérer ses toxines (Taur & Pamer, 2014).

1.4.2 Mécanismes de virulence

C. difficile sécrète principalement deux toxines nommées A et B. Ces toxines se fixent sur des récepteurs membranaires à la surface des cellules intestinales et sont endocytées par l'épithélium colique. Les deux toxines inactivent les protéines de bas poids moléculaire de la famille Rho liant le GTP par glycolysation dans le cytoplasme des entérocytes. La famille Rho des GTPases est une famille de petites protéines G de signalisation (~21 kDa) et est une sous-famille de la superfamille Ras. Cela entraîne une modification du cytosquelette et force la dissociation des jonctions serrées entre les cellules (INVS, 2006). Les toxines induisent une réaction inflammatoire intense avec recrutement de leucocytes de type granulocytes neutrophiles dans les tissus conjonctifs situés sous les épithéliums qui tapissent les muqueuses digestives appelées lamina propria. La production de médiateurs pro-inflammatoire active le système immunitaire et la production d'anticorps IgA puis IgG anti-*C. difficile* (Buyse *et al.*, 2005). Le système immunitaire produit des médiateurs protéiques appelés cytokines qui permettent la communication, l'activation et le recrutement des populations leucocytaires (Pothoulakis *et al.*, 1998). Les anticorps neutralisent les toxines et se fixent sur les antigènes de la bactérie, les leucocytes phagocytent ensuite les cellules végétatives. La réaction immunitaire est responsable de l'inflammation des tissus, de la mort cellulaire et la formation d'une pseudomembrane induisant une colite pseudomembraneuse potentiellement fatale chez l'individu infecté (Peniche *et al.*, 2013). Des expériences d'administration de toxines chez des rongeurs ont montré que la toxine A est responsable de l'apparition de lésions sur la muqueuse intestinale et d'une hypersécrétion intestinale alors que la toxine B n'a toute seule qu'un effet très faible (Buyse *et al.*, 2005).

Cependant, des études plus récentes ont montré que la toxine B est 1000 fois plus cytotoxique que la toxine A, des souches ne produisant que la toxine B sont souvent responsables d'ICD sévères (Abt *et al.*, 2016). Il existerait un effet synergique des deux toxines (Carter *et al.*, 2010; Poutanen & Simor, 2004). Des études chez les hamsters suggèrent que les deux toxines peuvent induire séparément des diarrhées, cependant ces résultats semblent contredire les résultats d'autres études. La réceptivité de l'hôte ainsi que des facteurs de virulences liées aux souches de *C. difficile* sont des facteurs à prendre en considération (Abt *et al.*, 2016).

1.5 Facteurs de virulence

1.5.1 Toxines

Le locus de pathogénicité de *C. difficile* code généralement pour cinq protéines et est localisé à un site spécifique du chromosome dans la plupart des souches (Hunt & Ballard, 2013). Les toxines A et B sont codées sur un îlot de pathogénicité chromosomique appelé PaLoc (Figure 1 PaLoC) (Abt *et al.*, 2016). Les toxines A et B sont deux grandes protéines contenant quatre domaines structurellement homologues (Pruitt *et al.*, 2010). La toxine A fait partie de la famille des entérotoxines et la toxine B fait partie de la famille des cytotoxines (Carter *et al.*, 2012). Ce locus transcrit aussi trois autres gènes accessoires : 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, similaire aux holines, un groupe de protéines lytiques qui pourraient permettre la lyse des cellules et faciliter la libération de TcdA et TcdB dans l'environnement extracellulaire, ces toxines étant dépourvues de peptide signal (Bouillaut *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2001). Les toxines A et B agissent en synergie et causent une inflammation en détruisant les tissus épithéliaux intestinaux. TcdA et TcdB contiennent des domaines RHO et RAC glucosyltransférase (GTD) à l'extrémité amino, ces domaines médient la toxicité en glycosylant et en inactivant ainsi les GTPases RHO et RAC de l'hôte dans le cytosol des cellules ciblées. Cela perturbe le cytosquelette et conduit à la dissociation des jonctions serrées entre les cellules épithéliales du côlon et à la perte de l'intégrité épithéliale (Hunt & Ballard, 2013). Adjacent à la GTD, TcdA et TcdB contiennent un domaine de cystéine protéase (CPD) qui clive de manière autocatalytique la glucosyl transférase dans le cytosol des cellules eucaryotes en association avec l'inositol hexakisphosphate (myo-inositol) (Abt *et al.*, 2016; Egerer *et al.*, 2007; Reineke *et al.*, 2007).

Les deux autres domaines de TcdA et TcdB consistent en une séquence protéique hydrophobe impliquée dans l'insertion de la membrane de l'hôte et les domaines répétitifs combinés oligo-peptidiques (CROP) qui sont supposés se lier aux récepteurs de surface cellulaire avant l'endocytose et l'internalisation de TcdA et TcdB (Abt *et al.*, 2016).

Le domaine CROP de TcdA contient jusqu'à 38 répétitions (Dingle *et al.*, 2008) avec une structure qui permet la liaison des glucides et s'associe à la gp96, une glycoprotéine présente à la surface apicale des colonocytes (Na *et al.*, 2008). Inversement, le domaine CROP de TcdB a moins de répétitions et s'associe avec le domaine extracellulaire N terminal du protéoglycane chondroïtine-sulfate 4 (CSPG), bien que l'expression de ce récepteur dans les cellules épithéliales intestinales n'ait pas encore été rapportée (Abt *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2015). Il a également été démontré que TcdB se lie au récepteur 3 du poliovirus receptor-like 3 (PVRL3), qui est exprimé à la surface des cellules épithéliales du côlon (Figure 1) (Abt *et al.*, 2016; LaFrance *et al.*, 2015).

Certaines souches de *C. difficile*, en particulier la souche hypervirulente BI / NAP1 / 027, expriment également une autre toxine, appelée toxine binaire ou *C. difficile* transférase (CDT), qui peut augmenter la virulence et qui n'est pas codée dans le locus de pathogénicité (Gerding *et al.*, 2014). Le rôle de la CDT dans la virulence reste à prouver, bien qu'il existe une association entre sa présence et une mortalité plus élevée chez les patients (Gerding *et al.*, 2014). CDT est composé de deux protéines, CdtA, une ADP-ribosyl transférase qui exercent une ribosylation de l'actine dans les cellules eucaryotes et CdtB qui forme des pores dans les endosomes acidifiés et facilite le transfert de CdtA vers le cytosol (Figure 1) (McDonald *et al.*, 2005). Le récepteur cellulaire de la CDT est le récepteur des lipoprotéines stimulé par lipolyse (LSR) (Papatheodorou *et al.*, 2011). La ribosylation interfère avec la polymérisation du maillage d'actine qui sous-tend la membrane cellulaire, ce qui se traduit par des protubérances cellulaires formées par les microtubules et une augmentation de fibronectine à la surface cellulaire, favorisant ainsi l'adhésion de *C. difficile* aux cellules ciblées (Abt *et al.*, 2016; Schwan *et al.*, 2014).

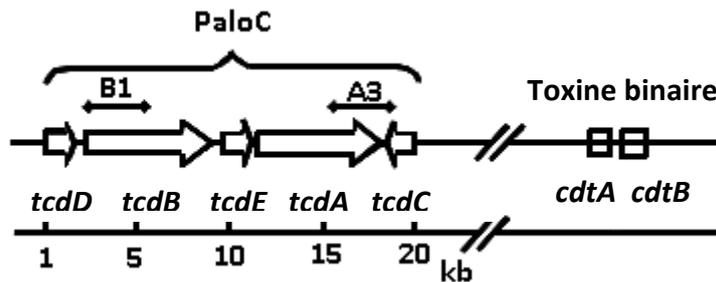


Figure 1 : Modèle schématique montrant les gènes majeurs présents dans le locus de pathogénicité (PaLoc) de *Clostridioides difficile* ainsi que les gènes codant pour la toxine binaire non présents sur le PaLoc.

Reproduced with the permission from (McDonald et al., 2005) Copyright Massachusetts Medical Society.

Certains facteurs peuvent réguler à la baisse l'expression des toxines chez *C. difficile*. Le facteur sigma TcdR présent sur le PaLoc 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. La disponibilité des nutriments, tel que les sources de carbones et d'acides animés présents dans l'environnement colonisé par *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 métabolisables dans le milieu de croissance réprime la production de toxines indépendamment des variations de pH dues au métabolisme du glucose (Dupuy & Sonenshein, 1998). Les sources de carbone pouvant réprimer la synthèse de toxines sont transportées par un système de phosphotransférase (PTS) dans la bactérie (Kazamias & Sperry, 1995). Un système de « *carbon catabolite repression* » (CCR) permet à la bactérie d'assimiler les sources de carbone comme le glucose lorsqu'elle est exposée à plus qu'un sucre de la façon la plus rentable pour la cellule (Martin-Verstraete *et al.*, 2016).

Le mécanisme principal qui contrôle CCR est le régulateur pléiotropique CcpA qui est aussi membre de la famille de répresseur LacI/GaI (Martin-Verstraete *et al.*, 2016). Le régulateur CcpA est sous l'influence entre autres du taux de glucose de l'environnement et possède des gènes impliqués dans l'absorption du sucre, la fermentation et le métabolisme des acides animés. CcpA peut interagir avec la région promotrice *tcdR* ou les extrémités 5' de plusieurs gènes du locus PaLoc afin de contrôler la production de toxines de *C. difficile* (Antunes *et al.*, 2012). La présence de proline, glycine et de cystéine régule également négativement la synthèse de toxines (Karlsson *et al.*, 1999).

Le régulateur global de transcription CodY peut 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 ce qui entraîne la répression de *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*. Aussi, de nombreux autres facteurs peuvent moduler la production de toxines chez *C. difficile* (Figure 2) (Abt *et al.*, 2016).

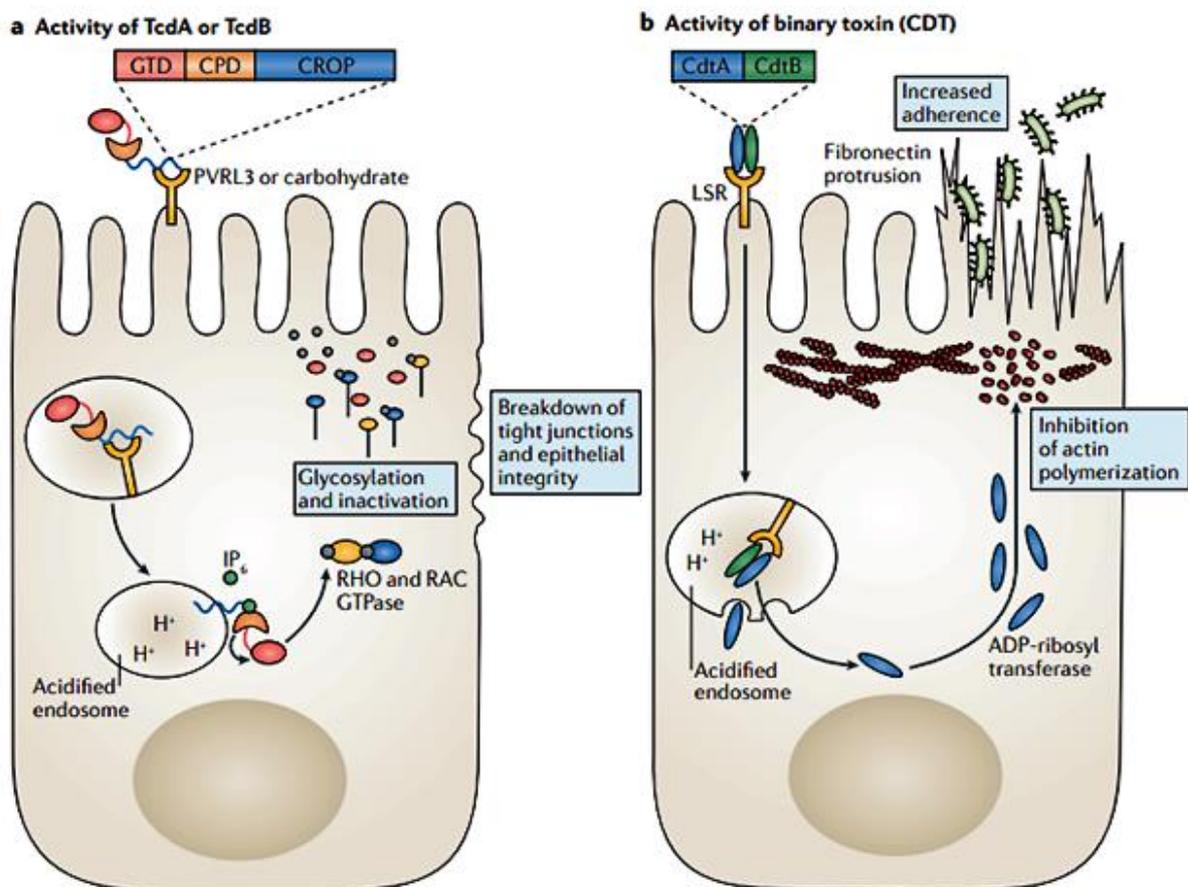


Figure 2 : Modèle schématique montrant les mécanismes d'action des toxines de *C. difficile* dans les cellules épithéliales.

Reproduced with the permission from (Abt et al., 2016) Copyright Nature Reviews microbiology, Springer Nature.

1.5.2 Sporulation

La sporulation est un processus qui intervient lorsque que les conditions environnementales ne sont pas propices à la survie de *C. difficile*. Les spores sont en effet résistantes à la chaleur, aux radiations, aux produits chimiques et aux antibiotiques, ce qui permet à la bactérie de survivre en condition difficile. Lors de la sporulation de *C. difficile*, un septum est construit à un pôle de la bactérie, ce qui entraîne une division asymétrique et la création de deux compartiments de taille inégale. Cette réaction est conduite suite à la phosphorylation de la protéine de sporulation A stage 0 (SpoOA) par une histidine kinase qui active une cascade de signaux qui permet la création d'une pré-spore dans la cellule mère de la bactérie (Abt *et al.*, 2016). La pré-spore mûrit dans un «sac de stockage» résistant au stress et stockant les chromosomes. La spore va ensuite être libérée dans l'environnement après la lyse de la cellule mère. 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). La germination de la spore peut être initiée par des acides biliaries, tels que le taurocholate, reconnu par le récepteur CspC. L'activation de l'enzyme SleC par CspB conduit à la dégradation du cortex de la spore puis finalement à l'excroissance d'une nouvelle cellule végétative lorsque les conditions redeviennent favorables (Figure 3) (Abt *et al.*, 2016). Le développement d'outils de plus en plus sophistiqués pour la génétique a permis l'identification de centaines de gènes impliqués dans la sporulation de *C. difficile* (Paredes-Sabja *et al.*, 2014).

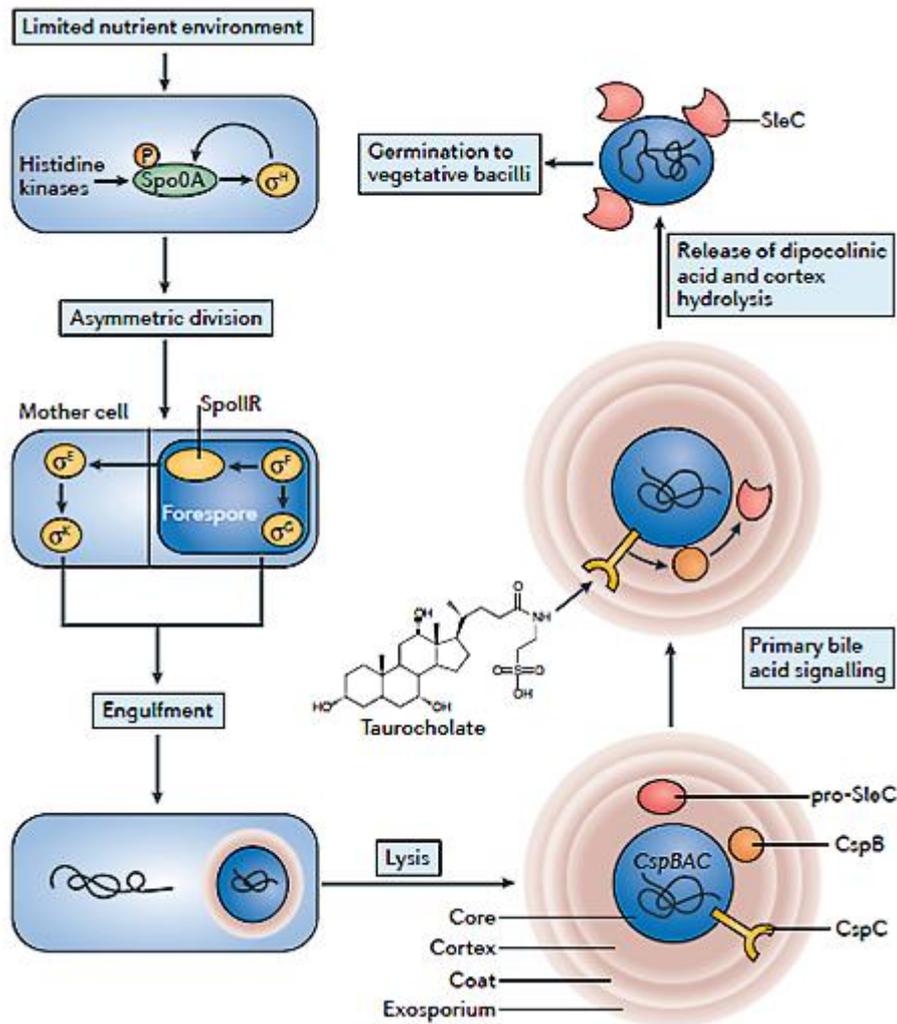


Figure 3 : Modèle schématique montrant les étapes de sporulation et de germination de *C. difficile*.

Reproduced with the permission from (Abt et al., 2016) Copyright Nature Reviews microbiology, Springer Nature.

1.5.3 Les protéines flagellaires

Le flagelle est subdivisé en cinq parties :

1. Le moteur flagellaire qui contrôle le mécanisme de rotation des flagelles.
2. Le corps basal enfoui dans la cellule et dont la structure diffère entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.
3. Le crochet qui fait la liaison entre le corps basal et le filament.
4. Le filament composé principalement d'une seule protéine, la flagelline, et qui est recouvert à l'extrémité par une coiffe.
5. L'appareil d'export flagellaire qui permet principalement le transport des protéines flagellaires (Desvaux et al., 2006).

Les flagelles jouent un rôle très important dans la mobilité bactérienne, l'adaptation aux niches biologiques et dans l'accès des pathogènes aux tissus cibles (Barketi-Klai, 2012; Duan *et al.*, 2013). L'expression flagellaire est hautement variable entre les souches de *C. difficile* (Pituch *et al.*, 2002). Il a été montré que l'absence de flagelles induit une altération de la motilité, de l'adhérence à l'épithélium intestinal, mais également de la formation de biofilm (Baban *et al.*, 2013; Ðapa *et al.*, 2013; Tasteyre *et al.*, 2001b).

Les souches mutantes dépourvues de composants de la machinerie flagellaire présentent une expression de toxines dérégulée et une virulence modifiée, ce qui suggère un lien entre l'expression flagellaire et la régulation des toxines (Aubry *et al.*, 2012; Baban *et al.*, 2013). Le gène *fliC* codant pour la flagelline FliC (39 kDa) et le gène *fliD* codant la coiffe du flagelle FliD (56 kDa) ont été identifiés chez la plupart des souches flagellées et non flagellées de *C. difficile* (Tasteyre *et al.*, 2000a; Tasteyre *et al.*, 2000b; Tasteyre *et al.*, 2001c). Les protéines recombinantes FliC et FliD sont capables de se lier *in vitro* à du mucus caecal murin. Seule la protéine FliD est en revanche capable d'adhérer à des cellules Vero radiomarquées. *In vivo*, des souches flagellées de *C. difficile* adhèrent 10 fois plus aux caeca de souris axéniques que des souches non flagellées. Tous ces résultats suggèrent fortement l'implication de ces protéines dans le processus d'adhésion de *C. difficile* (Tasteyre *et al.*, 2001b). Il a aussi été démontré que les flagellines de *C. difficile*, tout comme les flagellines d'autres espèces bactériennes, subissent une glycosylation. Ce phénomène est essentiel dans le processus d'assemblage des flagelles et par conséquent dans le processus de mobilité de *C. difficile* (Barketi-Klai, 2012; Twine *et al.*, 2009).

1.5.4 Autres facteurs de virulence

Chez *C. difficile*, l'expression d'autres facteurs de virulence est régulée par le second messenger intracellulaire dimère cyclique guanosine monophosphate (c-di-GMP). Le second messenger c-di-GMP est synthétisé à partir de GTP par la diguanylate cyclase. C-di-GMP active un riboswitch qui induit l'expression de pili de type IV qui interagissent avec l'épithélium intestinal et contribuent à l'agrégation de *C. difficile* et à la formation de biofilm (Bordeleau *et al.*, 2015).

La protéine A liant l'adhésine à la fibronectine, les protéines de la paroi cellulaire telles que Cwp66, la protéine A de la couche S et sa protéase Cwp84, ainsi que le régulateur principal de la sporulation Spo0A contribuent à l'adhérence de *C. difficile* et ont un rôle en formation de biofilm (Ðapa *et al.*, 2013).

La matrice extracellulaire du biofilm est composée de protéines, de polysaccharides, d'ADN libre, de cellules mortes et isolent les cellules végétatives du stress oxydatif, des anticorps et des antibiotiques, créant une niche protégée pour la sporulation (Abt *et al.*, 2016). *C. difficile* est également capable de persister dans le tractus gastro-intestinal. Il produit un composé phénolique bactériostatique appelé *p*-crésol et peut tolérer une concentration jusqu'à 0,4 % de *p*-crésol, ce qui est nettement supérieur à la majorité des autres bactéries (Hafiz & Oakley, 1976). Pour survivre aux différents types de stress rencontrés dans le tractus digestif, *C. difficile* use de plusieurs moyens de défense.

Il a été par exemple démontré que *C. difficile* possède trois facteurs sigma de la famille ECF (*Extra Cytoplasmic Function*) connue pour son système de transduction de signal en réponse à des stress extracellulaires. *C. difficile* est également capable de résister aux peptides antimicrobiens cationiques CAMPs (*Cationic AntiMicrobial Peptides*). Ces peptides, produits par l'hôte, permettent de tuer les bactéries contaminantes et éventuellement de stimuler la réponse immunitaire pour les éliminer. À l'instar d'autres pathogènes, *C. difficile* est capable de s'adapter à ces peptides antimicrobiens en augmentant l'expression de gènes de résistance aux CAMPs (McBride & Sonenshein, 2011).

1.6 Les protéines chaperons

Les protéines ne se résument pas seulement à une séquence d'acides aminés pour être fonctionnelles, mais doivent adopter une structure tertiaire ou quaternaire (pour les protéines multimériques) définies. Alors que quelques protéines peuvent se replier correctement *in vitro* dans des conditions idéales de pH, température, force ionique, le repliement des protéines n'est généralement pas spontané dans les conditions physiologiques (Anfinsen, 1973; Dobson & Ellis, 1998) et nécessitent des aides moléculaires appelées protéines chaperones. En effet, la forte concentration en protéines et macromolécules dans la cellule (encombrement moléculaire) ainsi que de nombreux facteurs et stress environnementaux (température, stress oxydants, etc.) peuvent affecter le processus de repliement.

Certaines protéines nécessitent des chaperons moléculaires afin d'adopter la structure adéquate alors que d'autres vont avoir besoin de telles chaperons en condition de stress, par exemple pour les protéines de choc thermique. Un mauvais repliement produit une protéine non fonctionnelle qui peut former des agrégats, mener à la dégradation des protéines ou former des composés toxiques pour la cellule (Ellis & Minton, 2006; Honoré, 2017).

Pour contrer ces problèmes de repliement des protéines, la cellule possède une machinerie complexe de chaperons moléculaires qui aident les autres protéines à se replier jusqu'à leur conformation native et permettent ainsi leur fonction physiologique.

Le terme de « protéine cliente » ou « protéine substrat » est utilisé pour parler de la protéine nécessitant l'intervention d'une protéine chaperon. Ainsi, la protéine cliente est libérée par la protéine chaperon lorsque cette dernière a rempli sa fonction et peut alors interagir avec une autre protéine cliente. Les protéines chaperons sont impliquées dans l'intégralité de la vie des protéines (Figure 4). En effet, certaines protéines chaperons interviennent dès que le peptide est en cours de synthèse par le ribosome. D'autres interviennent en conditions de stress ou bien pour diriger la protéine dans les bons compartiments cellulaires. Certaines permettent également de désagréger les agrégats protéiques et de dégrader les protéines. Enfin, il existe des chaperons spécifiques, spécialisés dans le repliement d'une seule protéine. Afin de conserver l'homéostasie des protéines (protéostasie), les protéines chaperons collaborent, formant ainsi le réseau protéostasique (Balchin *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013).

La quantité de protéine chaperon découverte est en constante augmentation et on ne cesse de mieux comprendre leur fonctionnement. Certains chaperons sont très conservés dans tout le règne vivant, comme par exemple ceux de la famille des « *heat shock proteins* » ou Hsp . Ces chaperons sont fortement induits lors de stress thermiques. *C. difficile* R20291 possède différentes protéines chaperonnes telles que DnaJ qui intervient dans la prévention de l'agrégation des protéines et co-chaperon de DnaK, DnaK participe au repliement co- et post-traductionnel, elle permet également une protection et réparation des protéines. La protéine GroEL participe au repliement post-traductionnel, ainsi qu'à la protection et réparation des protéines. GroEL participe aussi à l'adhésion des cellules de *C. difficile* (Hennequin *et al.*, 2001b; Honoré, 2017).

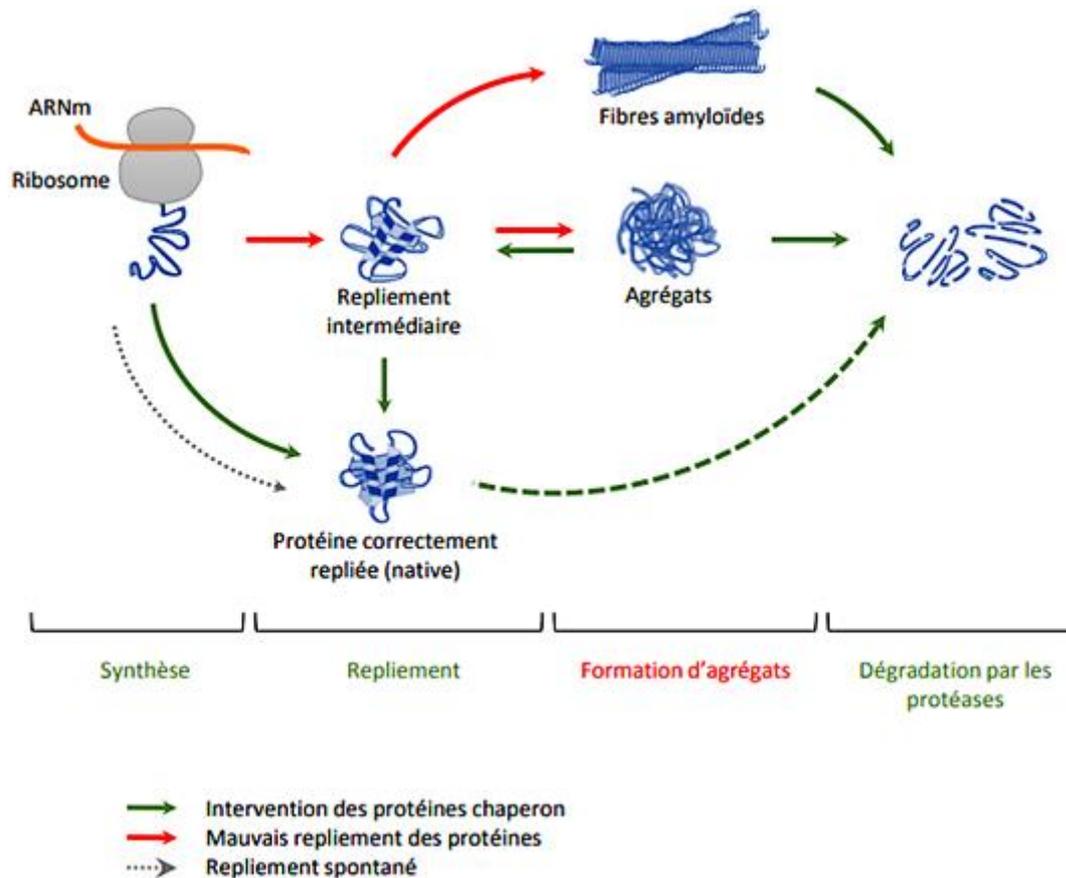


Figure 4 : Modèle schématique montrant l'implication des protéines chaperons au cours de la synthèse, du repliement, de l'agrégation et de la dégradation des protéines.

Reproduced with the permission from (Abt et al., 2016) Copyright Science.

1.7 Manifestations cliniques

La colonisation par *C. difficile* peut être asymptomatique ou symptomatique. Les signes cliniques et symptômes peuvent être de simples nausées, de la fièvre, une perte d'appétit et des crampes dans le bas de l'abdomen à des colites pseudomembraneuse parfois mortelles. Du mucus peut être observé dans les selles ainsi que du sang, surtout observé à un stade avancé de l'infection. L'infection se manifeste par des épisodes de diarrhées plutôt modérées au cours du traitement antibiotique ou longtemps après son arrêt (parfois plusieurs mois). (Barnett, 2012; Rodriguez et al., 2016) .Une diarrhée se caractérise par au moins trois selles liquides par jour pendant au moins deux jours. La colite pseudomembraneuse est une forme plus grave associée à des diarrhées plus fréquentes et plus abondantes et des lésions caractéristiques en forme de plaques jaunâtres, dites pseudomembranes.

Ces colites pseudomembraneuses représentent moins de 10 % des manifestations intestinales lors d'une ICD (Barnett, 2012). On parle également de colite fulminante, dans le cas de complications sévères pouvant engendrer des perforations coliques, un mégacôlon ou encore un iléus, nécessitant une intervention chirurgicale urgente. *C. difficile* peut également infecter l'intestin grêle avec formation de pseudomembranes dans le mucus iléal (Barnett, 2012). Le taux de mortalité associé à ce type d'infection est assez élevé et les ICD présentent un taux élevé de récurrences. En effet, 15 à 25 % des patients traités rechutent après un traitement de l'infection. Les récurrences se manifestent par une soudaine réapparition de la diarrhée et autres symptômes, après un traitement à la vancomycine ou au métronidazole (Johanesen *et al.*, 2015). Un patient qui présente une première récurrence a plus de risque de faire des récurrences par la suite, elles seraient dues à la persistance des spores, ou à une réinfection par une autre souche exogène. Environ la moitié des récurrences surviennent suite à une réinfection par une souche différente de *C. difficile* (Johanesen *et al.*, 2015).

2. Les facteurs de risques

2.1 Facteurs liés à l'hôte

2.1.1 Les antibiothérapies

La majorité des antibiotiques ont été associés au développement d'ICD, y compris les médicaments utilisés pour leur traitement tels que le métronidazole et la vancomycine (Leffler & Lamont, 2015). Les antibiothérapies sont les facteurs de risque les plus élevés des ICD primaires ou récurrentes. Environ 90% des ICD surviennent au cours ou à la suite d'antibiothérapies (Barbut *et al.*, 2011). Les antibiotiques qui présentent le plus de risque sont les antibiotiques à large spectre tels que les pénicillines et céphalosporines ainsi que la clindamycine et les fluoroquinolones (Leffler & Lamont, 2015). La clindamycine, ampicilline, amoxicilline, céphalosporines présenteraient un risque élevé (Tableau 1) (Brown *et al.*, 2013; Buyse *et al.*, 2005).

Les fluoroquinolones, co-trimoxalone, tétracyclines présenteraient un risque modéré alors que le métronidazole, vancomycine et rifampicine présenteraient un risque faible (Tableau 1) (Brown *et al.*, 2013; Buyse *et al.*, 2005). Le risque de développement d'ICD est 8 à 10 fois plus élevé durant le traitement et les 4 semaines suivant la prise des antibiotiques. Le risque de développement d'ICD est également 3 fois plus élevé au cours des 2 mois suivants (Hensgens *et al.*, 2012a). Une étude a rapporté que les patients traités pendant plus de 72 heures par antibiotiques avaient un risque de colite à *C. difficile* plus important que les patients ayant pris des antibiotiques pendant une durée moins importante.

La réduction de la prise et/ou de la durée de traitement des antibiotiques semble efficace pour diminuer significativement l'incidence des ICD (INVS, 2006). En effet, les antibiotiques détruisent le microbiote intestinal anaérobie et vont permettre aux souches de *C. difficile* de s'implanter et de se multiplier grâce à la persistance de la forme sporulée.

Le délai entre l'arrêt des antibiotiques et la survenue des ICD pourrait être dû au temps mis par les formes sporulées à revenir à l'état végétatif au sein de son hôte (Khanfer *et al.*, 2015).

Tableau 1 : Risques relatifs des ICD liés à l'antibiothérapie (Buyse, Azoulay *et al.* 2005).

Risque élevé	Risque intermédiaire	Risque faible
Ampicilline	Fluoroquinolones	Métronidazole
Amoxicilline	Tétracyclines	Vancomycine
Céphalosporines	Sulfamides	Rifampicine
Clindamycine	Macrolides	Bacitracine
	Chloramphénicol	

2.1.2 L'âge

Les personnes âgées de plus de 65 ans sont considérées comme plus à risque de développer une ICD. Cette prédisposition peut s'expliquer par des pathologies sous-jacentes plus sévères (Rouphael *et al.*, 2008). En effet, des hospitalisations fréquentes, une prise d'antibiotiques plus fréquente, une diminution de la réponse immunitaire, une modification du microbiote intestinal peut expliquer l'augmentation des cas après 65 ans. Selon une étude menée en 2010 sur 10 975 patients, les patients âgés de 61-70 ans, 71-80 ans et des patients de plus de 80 ans présentent respectivement 4,3 %, 9,4 % et 13,5 % de risque de mortalité, contre 2,5 % de risque pour des patients de moins de 60 ans (Karas *et al.*, 2010).

2.1.3 Les chimiothérapies

Les patients en oncologie présentent des taux élevés d'ICD en raison de la présence fréquente de facteurs de risque tels que les hospitalisations récurrentes, l'immunosuppression, l'utilisation d'antibiotiques, la chimiothérapie et l'utilisation de la nutrition parentérale (Hautmann *et al.*, 2011).

Certains agents chimiothérapeutiques, tels que les agents à base de platine, les taxanes et les inhibiteurs de l'ADN-topoisomérase, ont été signalés comme étant significativement liés aux ICD, mais ces résultats sont contredits dans d'autres études (Chopra *et al.*, 2010; Cózar-Llistó *et al.*, 2016).

La pathogenèse de l'ICD liée à la chimiothérapie n'est pas bien comprise mais le mécanisme suggéré est la perturbation du microbiote intestinal induite par la chimiothérapie, créant un environnement propice à la croissance de *C. difficile* (Chopra *et al.*, 2010). D'autres mécanismes possibles tels que des changements inflammatoires de la muqueuse intestinale, une diminution de la dégradation des toxines et une immunodépression générale liée au cancer pourraient prédisposer les patients aux ICD (Anand & Glatt, 1993; Bishop & Castillo, 2012; Loo *et al.*, 2011).

Chez ces patients, la diarrhée est la manifestation clinique la plus fréquente de l'ICD, avec de la fièvre et des douleurs abdominales (Garzotto *et al.*, 2015). Les ICD peuvent nécessiter un diagnostic différentiel. En effet, les agents chimiothérapeutiques peuvent provoquer des diarrhées (Cózar-Llistó *et al.*, 2016). Le traitement de l'ICD chez les patients présentant un cancer est similaire à celui des autres groupes, mais pourrait être compliqué en raison d'une détérioration générale comme la présence d'une mucite et des nausées liées à la chimiothérapie. Le taux d'ICD récurrent chez les patients cancéreux est similaire à celui de la population générale (Cornely *et al.*, 2013; Cózar-Llistó *et al.*, 2016).

Néanmoins, l'impact de l'ICD peut être important, car il peut entraîner un retard ou une réduction de la dose de chimiothérapie et/ou de radiothérapie (Garzotto *et al.*, 2015; Hautmann *et al.*, 2011). En raison de la physiopathologie complexe de l'ICD chez les patients cancéreux, des études prospectives plus larges sont nécessaires pour explorer les facteurs de risque et le comportement de cette infection dans ce groupe (Cózar-Llistó *et al.*, 2016).

2.1.4 Les inhibiteurs de pompe à protons

Depuis leur commercialisation à la fin des années 1980, les inhibiteurs de pompe à protons (IPP) sont devenus l'un des agents de problèmes gastriques les plus prescrits en milieu hospitalier à travers le monde (Trifan *et al.*, 2017) avec des ventes mondiales totalisant des milliards de dollars (Ladd *et al.*, 2014; Shaheen *et al.*, 2006).

Ces médicaments se sont avérés efficaces dans le traitement des ulcères, des reflux gastro-œsophagien, *Helicobacter pylori* (en combinaison avec des antibiotiques), Syndrome de Zollinger-Ellison, dans la prophylaxie des complications gastro-intestinales supérieures avec un traitement par anti-inflammatoires non stéroïdiens, la prophylaxie de l'ulcère de stress et la dyspepsie fonctionnelle (Moayyedi *et al.*, 2004; Pappas *et al.*, 2016; Trifan *et al.*, 2017). Le traitement par IPP inhibe profondément la production d'acide gastrique, ce qui entraîne la prolifération des spores et leur capacité à se convertir en une forme végétative de *C. difficile* (Amir *et al.*, 2014).

L'homéostasie intestinale est rompue et l'acide gastrique, un des mécanismes de défense de l'hôte, ne joue plus son rôle de barrière contre les bactéries ingérées et la prolifération bactérienne (Thorens *et al.*, 1996).

De plus, les IPP altèrent la fonction leucocytaire en inhibant la phagocytose et l'acidification du phagolysosome (Zedtwitz-Liebenstein *et al.*, 2002). Ainsi, pas moins de six méta-analyses ont trouvé une association significative entre le traitement des IPP et un risque accru d'ICD (Trifan *et al.*, 2017). Un tel risque est encore plus important quand le traitement par IPP est associé à une antibiothérapie ou à une chimiothérapie avec 43,2 fois plus de risque (Cunningham *et al.*, 2003). Pourtant, d'autres études et méta-analyses n'ont pas réussi à associer l'utilisation des IPP au développement de l'ICD (Trifan *et al.*, 2017).

2.2 Facteurs liés à l'environnement

2.2.1 Les hospitalisations

La plupart des cas d'ICD sont liés à une exposition aux soins de santé, une hospitalisation ou un séjour en maison de retraite, *C. difficile* étant la cause la plus fréquente de diarrhée nosocomiale (Czepiel *et al.*, 2019; Simor, 2010). Des études récentes suggèrent que l'incidence des ICD acquises dans la communauté augmente et pourrait avoir récemment atteint jusqu'à 30% de tous les cas d'ICD (Khanna *et al.*, 2012). Le pourcentage de patients hospitalisés colonisés par *C. difficile* diffère selon le pays, le groupe d'âge des patients et la durée de l'hospitalisation. Durant les premiers jours de l'hospitalisation, l'incidence de la colonisation par *C. difficile* varie de 2,1 à 20% (Czepiel *et al.*, 2019; Hung *et al.*, 2013; Loo *et al.*, 2011), et augmente avec un séjour hospitalier plus long. Les spores de *C. difficile* survivent dans l'environnement pendant plusieurs mois ; (Hensgens *et al.*, 2012b) les toilettes, le mobilier, les téléphones et les appareils médicaux (thermomètres, stéthoscopes) peuvent tous servir de réservoirs pour les spores de *C. difficile*. Les spores peuvent être manuportées aux patients par le personnel de santé.

Une bonne hygiène des mains avec du savon et de l'eau et l'utilisation régulière de gants en vinyle sont cruciales pour interrompre la transmission, comme l'ont démontré Johnson *et al.*, (1990). Les résidents des foyers de soins sont plus à risque d'ICD que l'ensemble de la population, mais présentent des risques moins élevés que les patients hospitalisés (15%). Cela est principalement dû à un âge plus avancé, à des comorbidités, à des hospitalisations plus fréquentes et à une antibiothérapie plus fréquente dans ce groupe par rapport à l'ensemble de la population.

2.2.2 Les transplantations d'organes

Les infections à *C. difficile* présente un véritable problème dans la transplantation d'organe solide (Arora *et al.*) (Donnelly *et al.*, 2015). On estime que le risque d'ICD dans ce groupe est jusqu'à cinq fois plus élevé que chez les autres patients. Ce risque plus élevé s'expliquerait par l'exposition récurrente aux environnements hospitaliers, les antibiothérapies et les thérapies immunosuppressives (Donnelly *et al.*, 2015; Paudel *et al.*, 2015). Une étude publiée en 2015 a estimé une prévalence de l'ICD de 7,4% chez les patients TOS (Paudel *et al.*, 2015). Cette méta-analyse a démontré que les patients transplantés d'un foie ou de poumons, ainsi que les receveurs de plusieurs organes, avaient tendance à avoir un taux plus élevé d'ICD par rapport aux receveurs de transplantation rénale. La plupart des cas d'ICD sont diagnostiqués au début de la période postopératoire et sont dus à une plus grande exposition aux facteurs de risque mentionnés ci-dessus pendant cette période (Cózar-Llistó *et al.*, 2016; Paudel *et al.*, 2015).

Les ICD chez les patients TOS sont également associés à une mortalité plus élevée, des admissions plus importantes dans des unités de soins intensifs (USI), un séjour hospitalier plus long, des coûts plus élevés ainsi que de mauvais résultats de transplantation (Donnelly *et al.*, 2015). Ce groupe présente des difficultés de diagnostic, car la diarrhée est une complication très courante chez les patients TOS, et peut être causée par des conditions infectieuses et non infectieuses.

Les médicaments immunosuppresseurs eux-mêmes sont une cause fréquente de diarrhée non infectieuse (Angarone & Ison, 2015). En résumé, l'ICD est un problème important chez les receveurs de TOS et avec une incidence croissante. Cette infection augmente les taux de mortalité et de perte de greffe chez ces patients. En raison de ce qui précède, des efforts particuliers sont essentiels pour prévenir, diagnostiquer et traiter adéquatement l'ICD chez les patients TOS (Cózar-Llistó *et al.*, 2016).

3 Les traitements

3.1 Les antibiotiques

L'antibiothérapie ne doit être instaurée que chez les patients présentant des symptômes d'ICD; la présence de la toxine *C. difficile* sans symptôme de l'infection n'est pas une indication de traitement. En 2014, la Société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses a publié des directives dans lesquels deux antibiotiques, le métronidazole et la vancomycine, étaient les médicaments à prescrire pour le traitement des ICD.

Le métronidazole était le médicament de première intention dans les ICD non sévères, tandis que la vancomycine était choisi pour les ICD sévères (Debast, 2014). Différentes études ont montré la supériorité de la vancomycine par rapport au métronidazole (Czepiel *et al.*, 2019). Le succès clinique est survenu chez 210 (81 %) des 259 patients traités par la vancomycine versus 202 (73 %) des 278 patients traités par le métronidazole. ($p = 0.02$). Depuis 2011, la fidaxomicine est également disponible. Il s'agit d'un antibiotique macrocyclique à spectre étroit, dirigé principalement contre les pathogènes à Gram positif.

Cet antibiotique a une grande efficacité contre *C. difficile*, en endommageant moins le microbiote du côlon que la vancomycine. La fidaxomicine a une efficacité comparable à la vancomycine et, dans certains groupes, une efficacité supérieure pour réduire la récurrence de l'ICD. Une récurrence d'ICD après le traitement du premier épisode par la fidaxomicine est survenue chez 15 % des patients contre 25 % des patients traités par la vancomycine (Cornely *et al.*, 2012; Czepiel *et al.*, 2019; Louie *et al.*, 2011). Cependant, il n'y avait pas d'amélioration significative entre les antibiotiques lorsque la souche hypervirulente NAP1/O27 était responsable de la récurrence. Une autre méta-analyse publiée a suggéré que la fidaxomicine peut être considérée comme le traitement de première intention de l'ICD (Cornely *et al.*, 2014).

L'étude de Guery *et al.* (2017) a montré qu'un traitement à la fidaxomicine montre des résultats supérieurs ($p = 0,03$) à la vancomycine entraînant une guérison clinique soutenue (30 jours après la fin du traitement) de l'ICD. Le taux de récurrence à 90 jours était également plus faible pour la fidaxomicine que pour la vancomycine (respectivement 9 % contre 18% , $p = 0,048$) (Guery *et al.*, 2018). En 2018, la Société des maladies infectieuses d'Amérique (IDSA) et la Société d'épidémiologie des soins de santé d'Amérique (SHEA) ont mis à jour leurs directives, soulignant que la vancomycine et la fidaxomicine étaient les traitements antibiotiques à prioriser dans le traitement des ICD (McDonald *et al.*, 2018).

D'autres antibiotiques qui montrent une activité contre *C. difficile* comprennent la teicoplanine, la tigécycline, la bacitracine et le nitazoxanide mais ne sont pas inclus dans les recommandations de traitement de l'ICD. Ils peuvent parfois être envisagés lorsque les options thérapeutiques de base sont épuisées. D'autres thérapies comme les thérapies immunitaires peuvent être envisagées pour le traitement ou la prévention de l'ICD car contrairement à la vancomycine, au métronidazole et à la fidaxomicine, elles ne perturberaient pas le microbiote intestinal de l'hôte (Czepiel *et al.*, 2019; Goldberg *et al.*, 2015).

3.2 Les chirurgies

Dans certains cas d'ICD, l'opération chirurgicale peut être nécessaire pour les patients souffrants d'infections sévères ne répondant pas aux traitements qui évoluent vers une toxicité systématique, une dilatation toxique du colon ou une perforation intestinale. L'ablation d'une partie du colon, dit colectomie partielle, permet de préserver une partie du rectum tout en créant une ouverture au niveau de l'abdomen qui permet l'évacuation des selles (iléostomie). Le taux de mortalité suite à des chirurgies d'urgence d'une ICD fulminante est de l'ordre de 19 à 71% suivant l'état clinique du patient au moment de la chirurgie (Bhangu *et al.*, 2012). En cas d'ICD fulminante, les colectomies sont préférables plutôt que de continuer le traitement médical actuel lorsqu'il n'y a pas d'amélioration du patient. Plus la colectomie est réalisée tôt durant l'infection, plus le patient aura de chances de survivre (Napolitano & Edmiston Jr, 2017). Des stratégies moins invasives sont à l'étude afin de préserver le colon. Une étude a démontré qu'une boucle d'iléostomie et un lavage du colon suivi de l'administration par intraveineuse de métronidazole et de vancomycine est une alternative efficace. Cette méthode entraîne une réduction de la mortalité dans les cas d'ICD sévère (Neal *et al.*, 2011). Cette stratégie est considérée comme un traitement alternatif à la colectomie totale uniquement chez certains types de patients (déconseillé pour les patients avec des risques de colons ischémiques, nécrose ou perforation) (Tertrais, 2017).

3.3 La transplantation fécale

La transplantation de microbiote fécal (TMF) est de plus en plus utilisée dans le traitement des ICD récurrentes. La TMF est une procédure connue depuis plus de 1000 ans, et a été décrite pour la première fois par un médecin chinois, Ge Hong (284–364 Avant J-C). Ce médecin a appliqué une suspension fécale humaine par voie orale à des patients souffrant de diarrhée sévère ou d'intoxication alimentaire (Zhang *et al.*, 2012).

Le premier rapport sur la transplantation fécale chez un patient souffrant de colite pseudomembraneuse a été publié en 1958 (GS & AJ, 1958). Van Nood *et al.*, (2013) ont mené une étude qui comparait trois schémas thérapeutiques : le premier groupe comprenait des patients ayant reçu une perfusion de matières fécales du donneur, le second un traitement de vancomycine, enfin le troisième groupe ont reçu un traitement de vancomycine suivi d'un lavage intestinal.

Un total de 81% des patients du groupe TMF ont eu une résolution de l'ICD, contre seulement 31 % des patients recevant de la vancomycine seule et 23 % recevant de la vancomycine avec lavage intestinal ($p \leq 0,001$ par rapport aux deux groupes témoins). Après TMF, les patients ont montré une diversité bactérienne fécale accrue, similaire à celle des donneurs sains (Van Nood *et al.*, 2013).

Une efficacité totale a été observée dans l'étude de 27 patients menée par Dutta *et al.* (2014) où les matières fécales étaient directement introduites dans l'intestin grêle et le gros intestin (Dutta *et al.*, 2014). La transplantation fécale de matière congelée, décrite pour la première fois par Borody et Khoruts a simplifié la procédure (Borody & Khoruts, 2012). Les échantillons de selles peuvent être conservés à - 80°C et utilisés pendant les 5 à 6 mois suivants. Certaines banques de selles prolongent la période de stockage de 2 ans (Terveer *et al.*, 2017). La matière fécale donnée est mélangée avec une solution saline, homogénéisée et filtrée pour séparer les parties solides afin d'obtenir un matériau fluide.

La transplantation fécale peut être administrée via des capsules orales, coloscopie, lavement de rétention ou une procédure du tractus gastro-intestinal supérieur (sonde nasojejunale/nasoduodénale) (Bafeta *et al.*, 2017). Les deux préoccupations principales sont le risque de transfert d'agents pathogènes infectieux du donneur au receveur et le développement de troubles immunologiques. La possibilité d'infecter le receveur est minimisée par un dépistage approprié des donneurs qui doivent être en bonne santé, avoir des selles formées quotidiennement et être dépistés pour les infections bactériennes, virales et parasitaires, comme cela est présenté dans Terveer *et al.*, (Terveer *et al.*, 2017). L'influence du microbiote intestinal sur certaines maladies à médiation immunitaire telles que le syndrome du côlon irritable soulève des inquiétudes quant aux effets secondaires à long terme de la transplantation fécale. Ce domaine de recherche est en pleine effervescence et mérite d'être approfondi car cette thérapie présente beaucoup de potentiel (Goldberg *et al.*, 2015).

3.4 Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps de synthèse, c'est-à-dire produits en laboratoire. Ils sont une copie d'un anticorps spécifique produit naturellement par le système immunitaire qui a été identifié comme étant efficace pour provoquer une réaction immunitaire contre une cible.

La présence d'un faible taux d'anticorps contre la toxine A de *C. difficile* est un facteur de risque majeur de développer une ICD. Les immunoglobulines ont été évaluées dans le traitement et prévention des ICD (Tertrais, 2017), majoritairement des gammaglobulines polyvalentes humaines administrées par perfusion. D'autres traitements par immunoglobuline G antitoxine A ont prouvé également leur efficacité dans le traitement des formes sévères d'ICD et des colites réfractaires à *C. difficile*. Ce traitement est donné en complément d'un traitement standard de métronidazole ou vancomycine (O'Horo & Safdar, 2009). Différentes études ont été réalisées afin d'étudier l'efficacité, la posologie, la fréquence et le délai d'administration des IgG. Le taux de succès thérapeutique est variable et ne permet pas de donner un consensus scientifique clair et précis sur l'utilisation de ce traitement dans la lutte contre les ICD (Negm *et al.*, 2017). L'administration d'IgA sécrétoires extraites de vaches immunisées par les toxines A et B durant 15 jours suite à un traitement par antibiotiques permet de fortement réduire les rechutes.

En 2010, une étude a démontré l'intérêt de l'utilisation de deux anticorps monoclonaux contre les toxines A et B pour la prévention secondaire des ICD pour des patients traités par métronidazole ou vancomycine. Les patients traités ayant une perfusion d'immunoglobulines avaient des taux de récurrences uniquement de 7% alors que le groupe placebo avait un taux de récurrences de 25% (Lowy *et al.*, 2010). Le bezlotoxumab, une solution injectable d'un anticorps monoclonal humain IgG contre la toxine B, s'est également montré efficace par inhibition de la liaison de la toxine B aux colonocytes. Il est notamment indiqué pour réduire les récurrences d'ICD chez les patients à fort risque d'ICD (Tertrais, 2017; Wilcox *et al.*, 2017).

4. Spécificités des souches hypervirulentes

4.1 Souche épidémique NAP1/BI/027

Au début du XXIème siècle, les ICD ont pris une dimension nouvelle avec l'apparition et la dissémination de nouvelles souches et plus particulièrement du clone NAP1/BI/027.

Ce clone décrit comme « hypervirulent » est responsable de plusieurs épidémies sévères particulièrement en milieu hospitalier (Burkholder & O’Riordan, 2016). Une étude phylogénétique comparative de génomes de 75 souches d’origines différentes montre que des souches hypervirulentes 027 représentent un groupe distinct génétiquement différent avec la présence de gènes associés à la virulence et à l’adaptation à la niche écologique.

Une étude menée à l’Université de Sienne a démontré l’importance des transferts horizontaux de gènes ainsi que l’importance des recombinaisons homologues qui rendent le génome de *C. difficile* aussi évolutif et dynamique. L’expansion des souches hyper virulentes serait donc majoritairement due à des adaptations génétiques (Barketi-Klai, 2012). La pression de sélection et l’environnement interviendraient aussi fortement dans l’expansion de la virulence de *C. difficile* (He *et al.*, 2010).

4.2 Spécificités génétiques des souches 027

Diverses études ont identifié des particularités génétiques entre les souches NAP1/BI/027. Une étude comparative des génomes de la souche épidémique R20291 (souche de PR 027 isolée en Angleterre suite à une épidémie à Stoke Mandeville en 2006), la souche non épidémique CD196 (première souche de PR 027 isolée en France en 1985) et la souche 630 (souche de PR 012 isolée en Suisse en 1982) a été réalisée (Stabler *et al.*, 2006). Cette étude a démontré que les souches 027 possèdent 234 gènes uniques par rapport à la souche 630. Parmi ces 234 gènes, 47 gènes étaient uniques à la souche R20291 et 3 gènes uniques à la souche CD196. Parmi les principaux gènes variants figurent des gènes de toxines, des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes flagellaires et des gènes régulateurs qui peuvent avoir un rôle très important dans la survie de la bactérie. Les souches 027 présentent des spécificités génétiques au niveau des gènes qui codent la toxine TcdB et le répresseur TcdC. Elles possèdent également les gènes qui codent les deux sous-unités de la toxine binaire, CDTa et CDTb contrairement à la souche 630 qui présente plusieurs délétions et mutations au niveau de leurs séquences. Les souches 027 sont également résistantes aux fluoroquinolones. Une étude plus approfondie montre qu’en plus de l’acquisition ou de la perte de quelques gènes, des mutations ponctuelles pourraient affecter l’expression de certains gènes. Parmi les trois souches étudiées (630, R20291 et CD196), 39 gènes seraient mutés et ainsi inactivés dont quatre seraient spécifiques à la souche épidémique R20291 (Barketi-Klai, 2012; Stabler *et al.*, 2010).

II. Les probiotiques

C'est en 2002 que la FAO (Food and Agricultural Organisation of the United Nations) a proposé de donner la définition du terme probiotique (FAO/WHO, 2002). Cette dernière a été entérinée par ISAPP en 2014 (Hill *et al.*, 2014). Un probiotique est défini comme un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Hill *et al.*, 2014). L'intérêt des probiotiques est croissant au Canada, ils regroupent différentes espèces bactériennes, mais on retrouve généralement des bactéries à Gram positif des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Certaines bactéries à Gram négatif peuvent être utilisées comme *Escherichia coli*, de même que des levures comme *Saccharomyces boulardii*.

1. Généralités sur les probiotiques

1.1 Historique

Ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que l'hypothèse que des micro-organismes vivants seraient bénéfiques dans la prévention des infections est émise. Le scientifique Elie Metchnikoff (1907) déduit que la consommation de produits fermentés comme les yaourts contenant des bactéries lactiques serait associée à une meilleure santé et longévité chez les populations bulgares. Il suggérera dans son ouvrage « *La prolongation de la vie* » que l'on pourrait modifier la flore intestinale et remplacer les bactéries nuisibles par des bactéries utiles à l'organisme. Une souche non pathogène d'*Escherichia coli* est isolée par le Professeur Alfred Nissle (1917) à partir de selles d'un soldat de la 1^{ère} guerre mondiale qui n'avait pas développé d'entérocolite lors des épidémies de Shigellose (Pietzka *et al.*, 2011). Lilly et Stilwell (1965) utilisent le terme « probiotique » pour la première fois comme une substance sécrétée par un organisme qui stimule la croissance d'un autre. Planche a décrit par la suite les probiotiques comme des organismes et substances qui contribuent à l'équilibre intestinal (Planche *et al.*, 2008). C'est en 1989 que Roy Fuller mettra l'accent sur la viabilité des probiotiques dans l'organisme (Fuller, 1991).

1.2 Caractéristiques des probiotiques

Les bifidobactéries et les souches de bactéries lactiques sont les bactéries les plus utilisées. Elles présentent des propriétés probiotiques et sont incluses dans de nombreux aliments fonctionnels et compléments alimentaires.

Il a été démontré que certains probiotiques peuvent prévenir et améliorer l'évolution des troubles digestifs tels que la diarrhée aiguë associée aux antibiotiques, les troubles allergiques tels que la dermatite atopique (eczéma), la rhinite allergique chez les nourrissons, certains troubles inflammatoires de l'intestin chez l'adulte ainsi que les ICD. De plus, certains probiotiques sont potentiellement intéressants dans le traitement des troubles métaboliques, notamment l'obésité, le syndrome métabolique, la stéatose hépatique non alcoolique et le diabète de type 2 (Plaza-Diaz *et al.*, 2019).

Cependant, les mécanismes d'action des probiotiques sont divers, hétérogènes et spécifiques à la souche. En plus d'être exempts de vecteurs capables de transférer la résistance aux antibiotiques, de facteurs de pathogénicité ou de toxicité, ils doivent être en mesure de survivre dans les conditions intestinales (pH acide, enzymes, sels biliaires, etc.). De surcroît, un probiotique peut présenter un antagonisme contre les agents pathogènes et une modulation du système immunitaire. Il doit avoir des effets bénéfiques vérifiables sur l'hôte. Le maintien de l'activité, la viabilité et l'efficacité de croissance du probiotique lors d'un traitement technologique doivent être démontrés (Plaza-Díaz *et al.*, 2017b; Plaza-Diaz *et al.*, 2019; Plaza-Díaz *et al.*, 2018). Cependant de très nombreux produits sont commercialisés sans ces bases scientifiques.

Ilya Ilyich Mechnikoff (1907) a réalisé les premières investigations sur les bactéries productrices d'acide lactique (BAL) et leurs effets sur la santé chez l'homme. Les résultats de ces premières investigations ont suggéré que l'ingestion de BAL améliorerait la santé de l'hôte. En 2014, l'Association scientifique internationale pour les probiotiques et les prébiotiques (ISAPP) a déclaré que le développement de sous-produits métaboliques, de micro-organismes morts ou d'autres produits non viables à base de microbes peuvent avoir des bénéfices sur la santé humaine. Cependant, ceux-ci ne relèvent pas de la construction probiotique (Hill *et al.*, 2014). Néanmoins, plusieurs études ont montré que les bactéries mortes et les composants moléculaires bactériens présentent des propriétés probiotiques (Plaza-Díaz *et al.*, 2017a; Plaza-Díaz *et al.*, 2017b; Plaza-Díaz *et al.*, 2018). Actuellement, le terme « postbiotique » fait référence à des composants solubles ayant une activité biologique qui pourraient donc constituer une alternative à l'utilisation de bactéries entières. Les postbiotiques peuvent se montrer avantageux notamment pour la conservation (Plaza-Diaz *et al.*, 2019; Tsilingiri *et al.*, 2012).

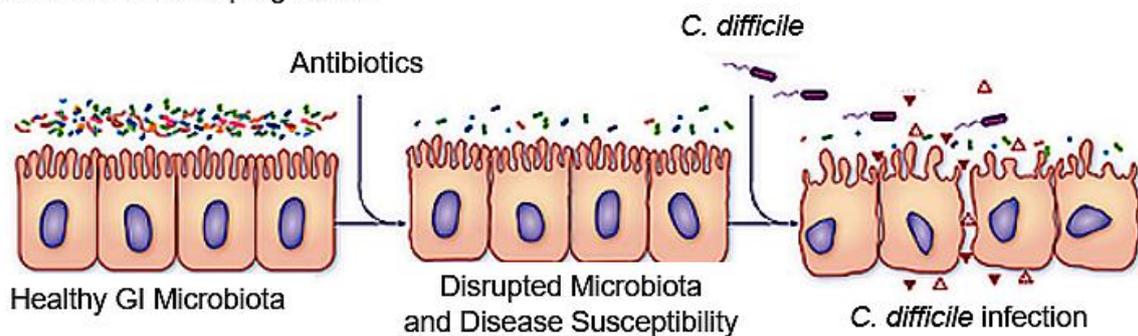
1.3 Intérêts des probiotiques

Les effets des probiotiques sur la santé de l'hôte ont été rapportés dans de nombreux articles et revues (Didari *et al.*, 2015; Szajewska, 2016). Ces études ont documenté le rôle des probiotiques dans la prévention des problèmes de santé, y compris les troubles digestifs tels que la diarrhée causée par des infections (Plaza-Díaz *et al.*, 2018), les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (Hempel *et al.*, 2012), le syndrome du côlon irritable (SCI) (Moayyedi *et al.*, 2010), les diarrhées associées à *C. difficile* chez les adultes et les enfants (Figure 5) (Goldenberg *et al.*, 2017; Spinler *et al.*, 2016), les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) tel que la rectocolite hémorragique (Ghoury *et al.*, 2014), les troubles allergiques telles que la dermatite atopique (eczéma) (Rather *et al.*, 2016) et la rhinite allergique (Berings *et al.*, 2017). L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) et la FDA américaine n'attribuent pas la capacité de traiter les maladies avec l'administration de probiotiques (Plaza-Díaz *et al.*, 2019). Les probiotiques sont commercialisés sous forme de compléments alimentaires dans de nombreux pays et suivent les politiques actuelles du marché.

Santé Canada a homologué certaines souches probiotiques [*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (SD5207), *Bifidobacterium breve* (SD5206), *Lactobacillus plantarum* (SD5209), *Lactobacillus paracasei* (SD5218), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (SD5220, SD5219), *Lactobacillus acidophilus* (SD5212), et *Lactobacillus helveticus* (SD5210)], différentes études ont également prouvées que certaines souches avaient des effets bénéfiques pour le soulagement des symptômes du SCI, tels que l'inconfort abdominal, les gaz et les ballonnements [*B. animalis* spp. *lactis* (LAFTI B94), *Lactobacillus acidophilus* (CL1285), *Lacticaseibacillus casei* (LBC80R), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (CLR2)] et d'autres (Plaza-Díaz *et al.*, 2019; Preston *et al.*, 2018). Les probiotiques peuvent aider à traiter les dysbioses, restaurer la diversité microbienne et modifier la microflore intestinale perturbée. Les probiotiques peuvent également aider à la résistance à la colonisation (Hickson, 2011) ce qui inclut la sécrétion de bactériocines, de métabolites ou de tous autres biosurfactants ayant une activité antimicrobienne (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). La croissance bactérienne des pathogènes peut être aussi affectée par une réduction du pH résultant de la production d'acides lactiques par les souches probiotiques (Abt *et al.*, 2016).

L'augmentation de la sécrétion de défensines, de mucus, et le renforcement des jonctions entre les cellules épithéliales peuvent également être des moyens utilisés par les probiotiques. Les probiotiques peuvent également avoir un rôle dans la modulation du système immunitaire, l'effet peut être local ou systémique. Ils peuvent jouer un rôle contre l'intolérance au lactose par la production d'enzymes telles que la bêta-galactosidase (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Plaza-Diaz *et al.*, 2019).

C. difficile disease progression



Probiotic prevention strategy

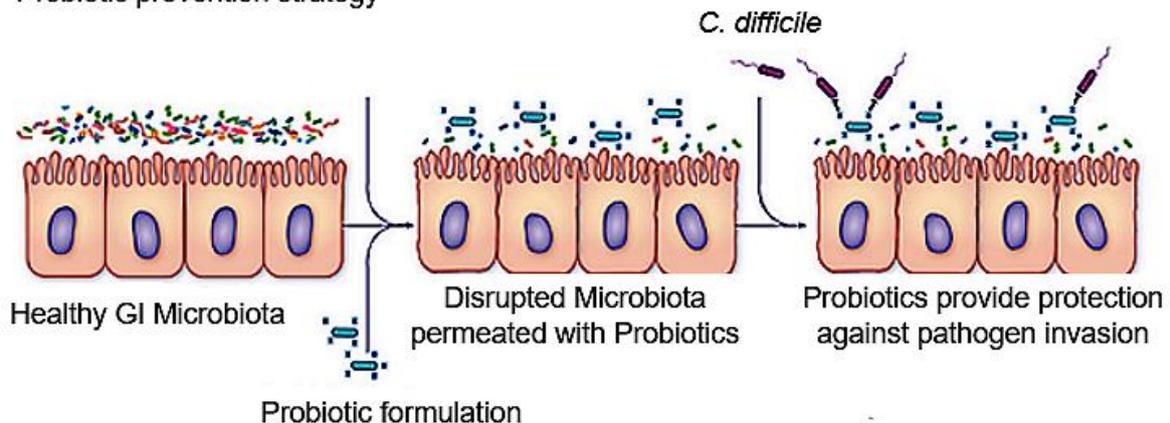


Figure 5 : Modèle schématique montrant la perturbation d'un microbiote gastro-intestinal sain par les antibiotiques ce qui augmente la sensibilité aux CDI (Spinler *et al.*, 2016).

Reproduced with the permission from (Spinler et al., 2016) Copyright Anaerobe.

1.4 Les probiotiques efficaces dans la prévention des ICD

Depuis 3 décennies, l'intérêt des probiotiques dans la prévention des ICD s'est accru et plusieurs souches ont démontrés cliniquement une certaine efficacité. Selon la souche, différents mécanismes anti *C. difficile* ont été décrits. Chez les levures par exemple, *S. boulardii* CNCM I-745 produit une protéase qui permet d'inactiver les toxines A et B de *C. difficile*. Les travaux d'une étude menée par Surawicz *et al.* (Surawicz *et al.*, 2000) ont démontré que la prise de *S. boulardii* durant l'antibiothérapie permet de réduire le pourcentage de récurrence de 33%. Cependant, dans une autre étude, *S. boulardii* n'a pas eu d'effet préventif sur les ICD chez les patients âgés (Pozzoni, 2012). Concernant les bactéries, *L. rhamnosus* peut améliorer l'immunité et la perméabilité intestinale. Les études montrent une diminution des risques d'ICD notamment chez les enfants (Yan & Goldman, 2020).

Il semble que le moment de prise du probiotique soit crucial, Shen *et al.* (Shen, 2015) ont récemment démontré l'importance d'administrer le probiotique le plus rapidement possible suivant la première prise d'antibiotique. Cela permet d'augmenter l'effet préventif.

Plusieurs études ont démontré la capacité de la combinaison probiotiques *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 (Bio-K+) à réduire l'incidence des DAA et des ICD chez les patients hospitalisés. Dans 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 ICD. Ces résultats ont permis l'obtention de deux allégations par Santé Canada stipulant que Bio-K+ aident à réduire les risques de DAA et aident à réduire les risques de ICD chez les patients hospitalisés.

Une étude observationnelle conduite à l'Hôpital Pierre-Le-Gardeur démontre que l'utilisation routinière de 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. Ces données ont été recensées par (INSPQ). Le taux d'ICD a été réduit de 18,0 cas par 10 000 patients/jour à une moyenne de 2,3 cas par 10 000 patients/jour.

Aucun effet secondaire sévère ni de problème d'utilisation du produit n'ont été répertoriés (Maziade *et al.*, 2013). Ces différentes études cliniques ont permis de démontrer les effets bénéfiques de la consommation des souches probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 dans la prévention primaire des DAA et des ICD. Cependant, les mécanismes d'actions employés étaient inconnus (Beausoleil *et al.*, 2007; Sampalis *et al.*, 2010). Plus tard, il a été démontré grâce à des tests de diffusion radiale et Agar Spot Test que les trois souches probiotiques testées induisaient une inhibition de la croissance de *C. difficile*. Cette inhibition est dû à la production d'acide lactique, ce mécanisme d'action « non spécifique » est commun au genre *Lactobacillus* sp. (Tejero-Sariñena *et al.*, 2012).

Une étude récemment menée par Gunaratnam *et al.* (Gunaratnam *et al.*, 2021) a démontré qu'il existait d'autres mécanismes d'action que l'acidification, caractéristique au BAL et potentiellement spécifiques aux trois souches probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2. Dans une expérience où l'acidification du milieu et la croissance de *C. difficile* sont contrôlés dans une co-culture avec les 3 lactobacilles, la quantité de toxines A et B détectées a diminué de 20 % et 41 %, respectivement. Les lactobacilles ont donc des mécanismes anti *C. difficile* qui restent à découvrir.

III. But, hypothèses et objectifs

L'utilisation des antibiotiques permet de sauver chaque jour des milliers de vies, cependant leur utilisation excessive confronte les populations mondiales à de nouveaux enjeux. Le niveau de résistance aux antibiotiques de nombreuses bactéries pathogènes est en forte hausse et la capacité des industries pharmaceutiques de découvrir de nouvelles molécules antibiotiques n'est pas infinie, ce qui a pour conséquence de se heurter à des impasses thérapeutiques pour le traitement de certaines infections. De plus, les dysbioses intestinales des patients qui reçoivent des antibiotiques mènent parfois à la sélection de bactéries pathogènes pouvant conduire à des infections comme les ICD, responsables de nombreux décès et avec un coût, pour le système de santé, qui se chiffre en milliards de dollars chaque année. Il faut également noter que les infections sont souvent récurrentes et engendrent des pertes économiques sur le long terme (Johanesen *et al.*, 2015). Au cours des dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur l'utilisation de probiotiques spécifiques dans la lutte contre les ICD. Les résultats de ces différentes études ont montré que l'utilisation de souches probiotiques spécifiques permettait de réduire significativement les risques de développer des ICD même sous antibiothérapie (Goldenberg *et al.*, 2017).

La formule composée des souches *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2, est homologuée par Santé Canada pour aider à réduire l'incidence des ICD et des diarrhées associées aux antibiotiques (DAA) (Auclair *et al.*, 2015; Beausoleil *et al.*, 2007; Sampalis *et al.*, 2010). Malgré son efficacité clinique démontrée pour la prévention des ICD, il existe peu d'informations quant aux mécanismes sous-jacents de cet effet prophylactique. Des travaux antérieurs ont démontré que les souches composant cette formule inhibent la croissance et la sécrétion des toxines A et B de *C. difficile* (CD) selon un mécanisme non-spécifique, c'est-à-dire via l'acidification du milieu de culture (Gunaratnam *et al.*, 2021). Cependant, l'inhibition de la sécrétion des toxines A et B a également été observée dans des essais de co-culture et ce, même lorsque le milieu de culture est tamponné. Le mécanisme de cette interaction est encore 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 ICD 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* en fermenteur;
- II) La présence de lactobacilles inhibe la synthèse des toxines de *C. difficile* en fermenteur ;
- III) La présence de lactobacilles inhibe l'expression des gènes de virulence de *C. difficile* ;

Les objectifs de ce travail sont les suivantes :

- I) Évaluer l'effet anti-toxine des souches probiotiques, indépendant de l'acidification du milieu, en fermenteur à pH contrôlé en temps réel.
- II) Effectuer une analyse transcriptomique pour vérifier l'impact de la co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques sur l'expression de l'ensemble des gènes de *C. difficile*.
- III) Confirmer par RT-qPCR la modulation de l'expression des gènes observée lors de l'analyse transcriptomique.

Premier moyen pour atteindre l'objectif 1 :

Afin de confirmer les résultats obtenus, l'effet des souches probiotiques sur l'expression des toxines de *C. difficile* a été confirmé dans un fermenteur permettant un contrôle constant du pH. La souche de *C. difficile* R20291 a été co-cultivée avec les trois souches probiotiques dans un fermenteur, en mode discontinu, à 37°C en anaérobiose. Le pH a été contrôlé en temps réel à l'aide d'une sonde de pH reliée à une station de contrôle et ajusté automatiquement à l'aide de NaOH. Des échantillons de biomasse ont été prélevés à différents temps et centrifugés afin de récupérer le surnageant. Les toxines A et B ont été quantifiées à partir du surnageant par ELISA à l'aide de la trousse *Separate detection of C. difficile toxin A/B* de tgcBIOMICS. Les culots ont été conservés à -80°C afin d'en extraire l'ARNm (Senchyna *et al.*, 2017).

Second moyen pour atteindre le l'objectif 1 :

La croissance de *C. difficile* a été évaluée par dénombrements sur la gélose sélective Cycloserine-Cefoxitin Fructose Agar (CCFA), tandis que les lactobacilles ont été dénombrés sur gélose de Man, Rogosa, Sharpe (MRS). Les géloses ont été incubées à 37°C dans une chambre anaérobie pendant 24-48 h. En parallèle, des essais de fermentation ont été fait sur *C. difficile* R20291 cultivée seule, ce qui a servi de contrôle pour l'expression des toxines A et B et pour l'expression génique.

Des fermentations ont également été réalisées avec les trois souches probiotiques cultivées ensemble sans *C. difficile* afin d'évaluer l'impact des conditions de culture sur leur croissance et récolter des échantillons pour l'extraction de l'ARNm (Gunaratnam *et al.*, 2019).

Premier moyen pour atteindre l'objectif 2 :

L'impact de la co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques sur l'expression de l'ensemble des gènes de *C. difficile* a été évalué par analyse transcriptomique. Des essais d'extraction d'ARNm de *C. difficile* ont été réalisés jusqu'à l'obtention d'ARNm de qualité suffisante permettant les essais de transcriptomique. Il a donc été nécessaire dans un premier temps d'optimiser le protocole d'extraction d'ARNm de *C. difficile*. Pour ce faire, la souche *C. difficile* R20291 a été cultivée en tube dans le milieu BHI à 37°C en anaérobiose (Gunaratnam *et al.*, 2019). Des échantillons ont été prélevés à différents temps et utilisés pour tester des protocoles d'extraction d'ARNm (phénol-chloroforme, kits commerciaux...). La qualité de l'ARNm a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant et dosée à l'aide d'un Nanodrop 2000C.

Second moyen pour atteindre l'objectif 2 :

Une fois le protocole optimisé, l'ARNm des échantillons conservés lors des essais de fermentation a été extrait et envoyé à L'Institut d'Immunologie et de Cancérologie de Montréal qui a procédé au séquençage de l'ARNm des échantillons à l'aide de la technologie HiSeq d'Illumina. Les conditions analysées ont été les suivantes: *C. difficile* cultivé seul, les trois souches probiotiques cultivées ensemble et la combinaison de *C. difficile* avec les souches probiotiques. Les données de transcriptomique ont été analysées à l'aide d'outils bio-informatiques, et des génomes des souches qui sont déjà disponibles. La littérature a ensuite été étudiée afin d'identifier les gènes dont l'expression a été modulée et impliqués dans la virulence chez *C. difficile* (Yang *et al.*, 2020).

Premier moyen pour atteindre l'objectif 3 :

Afin de confirmer les résultats de transcriptomique, il a été nécessaire de réaliser des essais de RT-qPCR sur les gènes d'intérêt sélectionnés lors de la réalisation de l'objectif précédent. Pour ce faire, des amorces ciblant les gènes d'intérêt sélectionnés ont été conçues à l'aide du logiciel Primer 3. La température optimale d'hybridation des amorces a été déterminée et l'efficacité ainsi que la spécificité des amorces ont été évaluées.

De plus, la stabilité des gènes de référence dans les conditions de co-culture entre *C. difficile* et les souches probiotiques a été déterminée afin de sélectionner les meilleurs gènes de référence (Devon *et al.*, 2010).

Second moyen pour atteindre l'objectif 3 :

L'ARN a été extrait, selon le protocole établi lors de la réalisation de l'objectif 1, à partir des culots bactériens conservés lors des différentes fermentations, transcrits en ADN complémentaire (ADNc) (*iScriptTM Reverse Transcription Supermix*), puis soumis à une réaction de qPCR (*SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix*) dans un thermocycleur à temps réel (*CFX96 Real Time System*, Bio-Rad). La modulation de l'expression des gènes sélectionnés a été calculée par la méthode du $\Delta\Delta C_t$ et comparée aux résultats obtenus lors des essais de transcriptomique (Yang *et al.*, 2020).

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

Objectif 1. Confirmation de l'effet anti-toxines des souches probiotiques

1. Souches bactériennes

La souche de *C. difficile* R20291 (BI/NAP1/027) a été fournie par le Professeur Louis-Charles Fortier, *Ph.D.* (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada). La souche a été cultivée dans le bouillon Reinforced Clostridial Medium (RCM; Oxoid, Nepean, Ontario, Canada) avec du glycérol (20% masse/volume) puis conservée par congélation à -80°C.

Lactobacillus acidophilus CL1285, *Lactocaseibacillus casei* LBC80R, et *Lactocaseibacillus rhamnosus* CLR2 ont été fournis par Bio-K Plus International inc., une entreprise appartenant au groupe Kerry (Laval, Québec, Canada). Les souches ont été cultivées dans le milieu De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) avec du glycérol (20% m/v) puis conservées et congelées à -80°C.

2. Croissance bactérienne

2.1 Cultures bactériennes

Des monocultures de *C. difficile*, des co-cultures de *C. difficile* avec les *Lactobacillus* sp. et des co-cultures de *Lactobacillus* sp. ont été réalisées afin de comprendre l'effet de la présence des lactobacilles sur *C. difficile*. *C. difficile* étant une bactérie anaérobie strict, les micro-organismes ont été cultivés dans une chambre anaérobie additionnée d'un mélange gazeux contenant 5 % d'hydrogène, 10 % de dioxyde de carbone et 85 % d'azote (MEGS Specialty Gases and Equipment, Pointe-Claire, Québec, Canada). Les chambres anaérobies sont utilisées pour fournir une atmosphère sans oxygène pour le travail avec des matériaux sensibles à l'oxygène. Le mélange gazeux d'hydrogène (H₂) circule à travers un catalyseur au palladium chauffé pour éliminer l'oxygène (O₂) en formant de l'eau (H₂O). Afin de permettre leur croissance dans la chambre anaérobie, un cryovial de *C. difficile* R20291 ($\approx 7 \log_{10}$ UFC/mL) a été décongelé et transféré dans une éprouvette contenant 9 mL de bouillon RCM stérile préalablement pré-réduit dans la chambre anaérobie puis incubé pendant 24 h à une température de 37°C sans agitation. Après 24 h, 3 mL de culture bactérienne de *C. difficile* ont été à nouveau transférés dans 27 mL de bouillon de culture RCM pré-réduit et toujours sans agitation. Ce deuxième repiquage permet de limiter le stress des bactéries durant la variation de température entre le congélateur à -80°C et la chambre anaérobie à 37°C.

De même, des cryovials de 1 mL des trois souches probiotiques ont été décongelés et transférés dans une éprouvette contenant 9 mL de bouillon MRS pré-réduit stérile puis incubés pendant 24 h à une température de 37°C sans agitation. Après 24 h, 3mL de culture de chaque lactobacille ont été à nouveau transférés dans 27 mL de bouillon de culture MRS dans les mêmes conditions de culture.

2.2 Détermination des concentrations bactériennes

Le troisième jour, les tubes contenant respectivement les différentes bactéries ont été fermés hermétiquement afin d'être sortis de la chambre anaérobie. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 3700 x g, suivi de deux lavages successifs des bactéries dans 20 mL de tampon phosphate 1X (PBS) stérile et pré-réduit. Après les lavages, les culots bactériens des différentes bactéries ont été suspendus dans 15 mL de milieu Brain Heart Infusion (BHI ; Alpha-Biosciences, Baltimore, Maryland, USA). Des échantillons de 1 mL des cultures bactériennes ont été prélevés et leur densité optique respective a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm grâce à un spectrophotomètre (Biomate Spectronic 10, ThermoScientific). Dans les monocultures, la $DO_{600\text{ nm}}$ de *C. difficile* est ajustée à 0,05, les co-cultures de *C. difficile* avec les souches probiotiques sont constituées des trois souches combinées sont ajustées à 0,5 chacune et de 0,05 pour *C. difficile*, à partir d'une $DO_{600\text{ nm}}$. Les volumes de chaque bactérie à ajouter ont été déterminés et réalisés à la suite de tests de viabilité avec la formule suivante :

$$V_{CD} = \frac{0,05 \times 15 \text{ mL}}{DO_{600\text{ nm}} \times dilution} \quad V_{LB} = \frac{0,5 \times 15 \text{ mL}}{DO_{600\text{ nm}} \times dilution}$$

V_{CD} représente le volume final de culture de *C. difficile* à inoculer dans le fermenteur, V_{LB} représente le volume final de l'ensemble des trois souches de lactobacilles à inoculer dans le fermenteur. Plusieurs tubes ont été nécessaires afin de faire croître les bactéries. En effet, les cultures bactériennes ont été par la suite réalisées dans un fermenteur équipé d'une cuve d'un volume de travail minimal de 2 litres pour permettre l'agitation du milieu. Les quantités de culture bactérienne inoculées étaient donc plus importantes que pour la croissance bactérienne en éprouvette.

Des contrôles de contamination ont été effectués en inoculant des géloses MRS avec 100 μL des cultures de *C. difficile* et 100 μL des cultures des lactobacilles sur des géloses CCFA. Les géloses MRS et CCFA ont ensuite été incubées en anaérobie pendant 24-48 h à 37°C.

3. Configuration des essais de fermentation

3.1 Norme de biosécurité

Avant de commencer les essais de fermentation avec une bactérie pathogène telle que *C. difficile*, des tests de validation ont été effectués afin de s'assurer que les cycles de décontamination permettaient d'éliminer l'ensemble des cellules végétatives et des spores issues des fermentations. Les premiers tests de fermentations ont été réalisés avec la bactérie *Clostridium hylemonae* (gracieusement fournie par Bio-K+ International inc.). Cette bactérie a été utilisée car elle est non pathogène, sporulante et croit dans un atmosphère anaérobie strict, donc un métabolisme similaire à *C. difficile*, mais sans la virulence du pathogène. Des essais de fermentations de *C. hylemonae* ont été effectués, des dénombrements bactériens ont ensuite été réalisés afin de confirmer la croissance de la bactérie dans le milieu. D'autres dénombrements bactériens ont ensuite été réalisés à la suite de la décontamination du fermenteur en autoclave afin de confirmer que le cycle de décontamination permettait d'éliminer l'ensemble des cellules végétatives de *C. hylemonae*. Les échantillons ont été prélevés dans la cuve, mais également dans toutes les tubulures du fermenteur. Les spores ont aussi été dénombrées avant la décontamination puis après afin de confirmer que le cycle de décontamination permettait d'éliminer les spores. Une fois les tests confirmés avec *C. hylemonae*, les mêmes tests ont été réalisés avec la bactérie *C. difficile*.

(Voir section Quantification des bactéries et spores sur géloses pour plus d'informations sur la méthodologie utilisée).

3.2 Transport des échantillons

Les échantillons ont été transportés en anaérobie entre la chambre anaérobie et le fermenteur grâce à des tubes « *Anaerobic Specimen Collector* » (BBL™ Vacutainer®). Ce système de transport a été sélectionné car les tubes possèdent un système d'élimination de l'oxygène intégré qui s'active en appuyant sur un piston. Il comprend également un indicateur d'oxygène qui change de couleur.

Ces tubes ont eux-mêmes été placés dans une jarre anaérobie possédant deux sacs permettant la réduction de l'oxygène. Les échantillons ont été inoculés dans le fermenteur BioFlo/CelliGen 115 (New Brunswick Scientific, Eppendorf, Enfield, Connecticut, USA) au travers d'un septum.

3.3 Anaérobie de la cuve

Les bactéries du fermenteur ont été cultivées en anaérobie complète avec le même mélange gazeux que dans la chambre anaérobie : 5 % d'hydrogène, 10 % de dioxyde de carbone et 85 % d'azote (MEGS Specialty Gases and Equipment). Le mélange gazeux circulait via un serpentin qui permettait une libération des gaz directement dans le milieu ; les gaz injectés étaient aussi reliés à la bouteille contenant le NaOH. La mise en route du fermenteur était effectuée 12 heures avant l'inoculation des bactéries afin d'enlever toute trace d'oxygène et d'avoir une température et un pH désiré.

3.4 Le système d'agitation

Le moteur de l'agitateur était situé au-dessus de la tête du fermenteur. Son amovibilité a permis de stériliser et décontaminer la tête et la cuve du fermenteur dans l'autoclave sans l'endommager. La vitesse d'agitation du moteur était réglée à 55 tours par minute.

3.5 Le pH

L'utilisation du fermenteur a permis le contrôle du pH à 7 en continu. Le pH était mesuré grâce à une sonde (Mettler Toledo) remplie de gel. Le contrôle était maintenu par un contrôleur P & I (proportionnel et intégral) qui fonctionnait avec des pompes, affectées à l'ajout d'acide ou de base. Il a également été possible de sélectionner une valeur de zone morte pour contrôler le pH dans la plage assignée : aucun acide ou base n'a été ajouté lorsque la valeur de pH était dans la zone de tolérance. La sonde de pH a été calibrée avant chaque stérilisation.

3.6 Le contrôle de la température

La température du milieu était réglée à 37°C. Elle était contrôlée par le logiciel de supervision qui envoyait ensuite les informations à une couverture chauffante placée autour de la cuve. Un serpentin en métal était placé à l'intérieur de la cuve et connecté à un bain marie externe.

Il permettait de faire circuler une eau à 5°C afin de réguler la température avec la couverture chauffante. La température du milieu était détectée par un détecteur de température à résistance (RTD) immergé dans un canal étanche pénétrant le milieu.

3.7 La sonde de dioxygène dissout (OD)

L'OD était détecté par une sonde polarographique. Il était important de calibrer la sonde avant chaque fermentation et de s'assurer de son bon fonctionnement en changeant régulièrement la solution d'électrolyte. Le pourcentage d'OD étant de 100% avant l'injection des gaz dans le milieu et de 0% durant les fermentations.

3.8 Le système d'échappement

Afin de permettre le renouvellement de gaz dans le milieu et d'éliminer le dioxygène présent, un système d'échappement était mis en place. Les gaz d'échappement passaient dans un condenseur d'échappement où l'humidité était éliminée, puis renvoyés dans la cuve. Les gaz restants passaient ensuite à travers un filtre d'échappement de 0,2 µm puis étaient éliminés sous une hotte. Il était très important de s'assurer du bon fonctionnement du système d'échappement durant chaque fermentation afin d'éviter le risque d'explosion.

3.9 Logiciel de supervision

Le système BioFlo/CelliGen 115 a été contrôlé grâce à un écran tactile via le logiciel de supervision en option New Brunswick BioCommand (Software revision 05.01).

4. Quantification sur gélose

4.1 Bactéries

Des échantillons de 1 mL des monocultures de *C. difficile*, des co-cultures des lactobacilles et des co-cultures de *C. difficile* avec les lactobacilles ont été collectés à 0, 12 et 24 h afin d'évaluer les concentrations bactériennes. Des dilutions en série dans de l'eau peptonée pré-réduite suivies de dénombrements bactériens ont été effectuées sur gélose CCFA dans des conditions d'anaérobies pour *C. difficile* (37°C pendant 24–48 h).

Les lactobacilles ont été dénombrés sur gélose MRS sous atmosphère aérobie (37°C pendant 48 h). Des échantillons de 100 µL des dilutions ont été étalés sur les géloses à l'aide de billes de verre stériles. Des contrôles de stérilité sur des géloses ont été effectués dans chaque expérience.

4.2 Spores

Des échantillons de 4 mL ont été prélevés avant et après la décontamination du fermenteur. Ils ont été placés sous une hotte biologique en contact de dioxygène et supplémentés de 4 mL d'éthanol concentré à 100%. Les tubes ont été placés pendant 1 h à température ambiante en aérobie afin d'éliminer les cellules végétatives pour ne dénombrer que les spores. Le dénombrement des spores a été effectué dans une gélose sélective Muller-Hinton cation supplémenté avec 1% de glycine et 1% d'acide taurocholique permettant la germination de spores (MHBCA-TAG, Oxoid, Nepean, Ontario, Canada) dans des conditions d'anaérobies (37°C pendant 24–48 h) (Wilson *et al.*, 1983).

5. Quantification des toxines A et B

Des échantillons de 3 mL des mono-cultures et des co-cultures de *C. difficile* ont été collectés après 12 et 24 h de fermentation afin d'évaluer les concentrations des toxines A et B. Les échantillons ont été centrifugés durant 10 min à 3700 × *g* (Legend RT Plus, ThermoFisher Scientific) et le surnageant a été filtré à 0.2 µm. La quantification des toxines A et B a été réalisée en utilisant la méthode ELISA d'un kit (tgcBIOMICS GmbH, Mainz, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant.

Les échantillons ont été ajoutés dans les puits d'une plaque de microtitration 96 puits recouverts d'anticorps spécifiques de la toxine A ou B puis incubés pendant 60 min à 37°C. Les puits ont été lavés trois fois avec le tampon de lavage fourni, les antitoxines A et B ont été ajoutés et les puits ont été incubés à 37°C pendant 30 min. Ensuite, l'ajout d'un substrat a permis un développement de couleur après 15 min d'incubation. Le développement de la couleur a été arrêté par l'ajout de H₂SO₄. Le développement de la couleur a été mesuré par densité optique avec un spectrophotomètre (Vmax software, Molecular Devices, California, USA) à 450 et 650 nm. Afin de pouvoir mesurer la concentration en toxines des échantillons traités, une courbe standard a été réalisée avec des échantillons purs des toxines A et B inactivées. La concentration de toxines a été rapportée en fonction de la concentration bactérienne dans les échantillons (ng/UFC) (Gunaratnam *et al.*, 2019).

6. Analyses statistiques des cultures bactériennes

Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm écart type de plusieurs tests de monoculture et co-culture effectués en triplicata lors des études de fermentation. La croissance (\log_{10} UFC/mL) a été comparée entre les mono et co-cultures en utilisant un test ANOVA à sens unique où les valeurs de p inférieures ou égales à 0,05 ($P \leq 0,05$) ont été considérées comme significativement différentes.

Objectif 2. Évaluation de l'impact de la co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques sur l'expression de l'ensemble des gènes de *C. difficile* par transcriptomique.

1. Optimisation de l'extraction de l'ARNm de *C. difficile*

Plusieurs techniques ont été testées afin d'optimiser l'extraction d'ARNm de *C. difficile*. Dans un premier temps, l'extraction de l'ARNm de *C. difficile* a été faite avec le kit RNeasy Mini Kit qui propose une extraction enzymatique et mécanique (Qiagen), puis en combinant le RNase-Free Dnase Set (Qiagen) et le RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen). Des échantillons de cultures de 24 h de *C. difficile* seul et de *C. difficile* en co-culture avec les souches probiotiques ont été testés. Cette technique ne permettait pas d'obtenir d'ARNm non dégradé. Par la suite, les temps de cultures ont été réduits, des échantillons issus de culture de 6, 8, 12 et 18 h ont été testés. De plus, afin d'obtenir un meilleur rendement de l'ARNm extrait, les quantités initiales de bactéries conseillées pour l'extraction ont été augmentées jusqu'à 4 mL (7 log UFC/mL) pour *C. difficile*. Afin de s'assurer d'avoir un échantillon d'ARNm exempt d'ADN, un traitement supplémentaire à la DNase a été réalisé en utilisant le TURBO DNA-free Kit (Ambion). Après extraction, les échantillons ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant contenant 1 % d'agarose et 4 % hypochlorite de sodium dans un tampon TBE 1X et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Cette méthode de visualisation d'ARNm a été adaptée d'un protocole d'Aranda *et al.*, (2012). Cependant, cette méthode d'extraction ne permettait pas d'obtenir une quantité d'ARNm suffisante pour l'étude transcriptomique (supérieure à 100 ng/μL) et l'ARN était dégradé.

Les ratios 260/230 qui indique la présence de protéines, phénol et autres contaminants étaient inférieurs à 1,8 et les ratios 280/230, qui indique la présence de contaminants co-purifiés, étaient également inférieurs à 1,8.

Une autre méthode d'extraction de l'ARNm avec du TRIzol a été testée en suivant le protocole fourni par le Professeur Louis-Charles Fortier de l'Université de Sherbrooke (communication). L'extraction au phénol-chloroforme fait intervenir un mélange équimolaire de chloroforme CHCl_3 et de phénol $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ avec un chaotrope tel que le thiocyanate de guanidinium $[\text{CH}_6\text{N}_3]^+\text{SCN}^-$ ou le chlorure de guanidinium $[\text{CH}_6\text{N}_3]^+\text{Cl}^-$. Les protéines ainsi dénaturées s'accumulent dans la phase organique phénol: chloroforme, tandis que l'ARNm est dissous dans la phase aqueuse avec les autres composés hydrophiles tels que les sels ou les oligosaccharides ; l'ADN se trouve généralement proche de l'interface entre les deux phases (Dupuy *et al.*, 1998).

Les acides nucléiques peuvent être précipités sélectivement avec de l'éthanol ou de l'isopropanol après séparations des deux phases par centrifugation et récolte de la phase aqueuse (Chomczynski & Sacchi, 1987). Des échantillons de 4 mL de culture de *C. difficile* seul et en présence des souches probiotiques ont été prélevés après 6, 10, 12, et 24 h de culture. Les échantillons ont été centrifugés 10 min à 3700 x g, les culots ont été resuspendus dans 1 mL de TRIzol puis incubés 5 min à température ambiante pour permettre une complète dissociation des complexes acides nucléiques-protéines. À la suite de l'incubation, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés. Après une centrifugation, la phase aqueuse a été prélevée et une deuxième extraction au TRIzol/ chloroforme a été réalisée. L'ARNm a été précipité avec 500 µL de d'isopropanol 70% et incubé 10 minutes à température pièce puis lavé à l'éthanol 70% (1mL) avant d'être resuspendu dans de l'eau sans Rnase. L'ARNm 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. Les échantillons d'ARNm ont été migrés sur gel dénaturant et visualisés par coloration au bromure d'éthidium et exposition UV (Chomczynski & Sacchi, 1987; Gunaratnam, 2019). Grâce à cette méthode, les quantités d'ARNm extrait étaient supérieures à 100 ng/µL, cependant l'ARNm était dégradé et les ratios bien inférieurs à 1,8.

La troisième méthode testée utilisait le kit RNeasy Mini (Qiagen) avec des modifications. Dans un premier temps, pour chaque condition, des échantillons de 1 mL de milieu de fermentation ont été collectés afin de ne pas saturer les colonnes du kit. Les échantillons ont ensuite été mélangés avec 500 µL d'acétone et 500 µL d'éthanol et non du RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) selon les recommandations de (Daou *et al.*, 2019). Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à l'extraction. Les échantillons ont été décongelés sur glace et centrifugés pendant 15 min (4 150 x g, 4°C). Les surnageants ont été resuspendus dans 100 µL de tampon RLT contenant 10% de 2-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich). Les suspensions bactériennes ont été transférées dans un tube vissé contenant des billes lavées à l'acide (Sigma-Aldrich). Les solutions bactériennes ont ensuite été lysées dans un *bead beater* (9 x 30 s, 4m s⁻¹; Fastprep-24, MP Biomedicals, Santa Ana, USA) avec une étape de refroidissement sur glace entre les cycles. Le temps total de la lyse était de 4 min. Les tubes ont ensuite été centrifugés durant 5 min afin d'éliminer les résidus de billes (10 000 x g). Par la suite, 1 ml d'éthanol concentré à 70% a été ajouté au surnageant, puis l'ensemble du lysat a été transféré en plusieurs étapes en aliquots successifs dans une colonne du kit. Une fois le tube centrifugé, 700 µL de tampon RW1 ont été ajoutés à la colonne. Le tampon RW1 contient un sel de guanidine, ainsi que de l'éthanol, et est utilisé comme tampon de lavage rigoureux pour éliminer efficacement les glucides, les protéines et les acides gras.

Après centrifugation, la colonne a été placée dans un nouveau tube et 3 lavages avec 500 µL de tampon RPE avec éthanol ont été réalisés. Il est important que le lavage avec le tampon RPE recouvre entièrement la colonne y compris sous le bouchon du tube, une étape d'incubation de 3 min a été réalisée avant le dernier lavage. La composition exacte du tampon RPE est confidentielle. Sa fonction principale est d'éliminer les traces de sels qui sont encore sur la colonne, en raison des tampons utilisés plus tôt dans le protocole. L'éthanol, qui est ajouté est un ingrédient important du tampon RPE. La colonne a ensuite été placée dans un nouveau tube puis centrifugée à vitesse maximale afin d'éliminer les résidus de tampon restants. La colonne a finalement été placée dans un nouveau tube auquel 50 µL d'eau sans RNase a été ajouté puis centrifugé. Les concentrations en ARNm ainsi que la qualité des échantillons ont été déterminées grâce au spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

2. Traitement Turbo DNA-free kit sur des échantillons d'ARN

L'ADN génomique résiduel a été éliminé grâce au kit Turbo DNA free (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Il est important de traiter les échantillons d'ARNm afin d'assurer l'élimination des traces d'ADN résiduelles dans l'échantillon en évitant les faux signaux positifs en mesurant uniquement l'abondance de l'ARN (ARNm, microARN ...). Un volume de 5 µL de tampon 10X TURBO DNase™ et 1 µL de l'enzyme TURBO DNase™ Enzyme ont été ajoutés à l'ARNm. Les tubes ont été incubés durant 30 min à 37°C. Le réactif d'inactivation de la DNase a été remis en suspension puis 0,1 volume de ce réactif ont été ajoutés à l'ARNm. Par exemple, si le volume d'ARNm est de 50 µL et que 1 µL de TURBO DNase™ a été utilisé à l'étape précédente, 5 µL de réactif d'inactivation de DNase devaient être ajoutés.

Au moins 2 µL de réactif d'inactivation DNase doivent être utilisés. Les échantillons ont été incubés durant 5 minutes à température ambiante. Si la température ambiante descendait en dessous de 22 à 26 °C, les tubes devaient être déplacés vers un bloc chauffant ou un four pour contrôler la température. Les environnements froids peuvent inhiber l'inactivation de l'enzyme TURBO DNase™, laissant de la DNase résiduelle dans l'échantillon d'ARNm. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 10, 000 x g durant 1 min et 30 sec. La première phase aqueuse contenant l'ARNm a été prélevée.

3. Évaluation de la quantité et de la qualité de l'ARN avec le Nanodrop

La section « *RNA detection* » du logiciel de Nanodrop a été utilisée afin de quantifier l'ARNm. Le blanc a été préparé en pipetant 2 μ L d'eau sans nucléase placée au centre du socle optique inférieur. Il faut s'assurer de baisser le levier délicatement afin de ne pas faire bouger la goutte. Le blanc a été soigneusement enlevé à l'aide d'une lingette Kimwipe. Un volume de 2 μ L des échantillons d'ARNm ont été placés au centre du socle optique inférieur. La concentration et les ratios de chaque échantillon ont pu être mesurés.

4. Visualisation de l'ARN par électrophorèse sur gel d'agarose

Les concentrations en ARNm ainsi que la qualité des échantillons ont été déterminées grâce au spectrophotomètre NanoDrop 1000. Les échantillons ont ensuite été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant contenant 1 % d'agarose et 4 % d'hypochlorite de sodium suspendus dans du TBE 1X et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Cette méthode de visualisation d'ARNm a été adaptée d'Aranda *et al.*, (2012). Grâce à cette méthode de conservation avant extraction et de l'extraction en elle-même de l'ARNm, les concentrations mesurées étaient supérieures à 100 ng/ μ L. Les ratios 260/230 et 260/280 étaient supérieurs à 2. Les échantillons prélevés après 12 h de fermentation ont été envoyés à l'Institut de recherche en immunologie et en cancérologie ou les RIN ont été analysés et acceptés.

5. Transcription inverse des échantillons d'ARN en ADNc

Afin de convertir l'ARNm en ADNc, un kit de transcription inverse de QuantiTect a été utilisé. L'ARNm a été décongelé sur glace, le tampon d'élimination de l'ADNg, la transcription inverse Quantiscript, le tampon Quantiscript RT, le mélange d'amorces RT et l'eau sans RNase ont été décongelés à température ambiante et resuspendus délicatement. La réaction d'élimination de l'ADN génomique sur glace a été effectuée selon le tableau 2.

Le protocole devait être utilisé avec des échantillons contenant de 10 pg à 1 μ g d'ARNm. Si les échantillons avaient une concentration supérieure à 1 pg d'ARNm, il fallait augmenter la quantité des réactifs de manière linéaire.

Tableau 2 : Composants de la réaction d'élimination de l'ADN génomique.

Composants	Volume/réaction
Tampon de suppression d'ADNg, 7x	2 µL
ARNm contenant jusqu'à 1 pg	Variable
Eau sans RNase	Variable
Volume total de la réaction	14 µL

Les tubes ont été incubés durant 2 min à 42°C puis placés immédiatement sur glace. La préparation du *Master mix* a été réalisée selon le tableau 3. Pour le contrôle NRT, le tampon et le mélange d'amorces ont été ajoutés dans le tube, mais la transcriptase a été remplacée par de l'eau sans nucléase.

Tableau 3 : Composants de la réaction de transcription inverse.

Composants	Volume/réaction
<u>RT <i>Master mix</i></u>	
Transcriptase inverse Quantiscript *	1 µL
Tampon RT Quantiscript, 5X	4 µL
RT Primer Mix	1 µL
<u>ARN</u>	
Réaction d'élimination de l'ADN génomique entier (réalisée à l'étape 2 de ce protocole).	14 µL
Volume total de la réaction	20 µL

* Pour le contrôle NRT, remplacer par de l'eau sans nucléase

L'ARNm de l'étape 2 (14 µl) a été ajouté à chaque tube contenant le *Master mix* de transcription inverse (ou NRT). L'ensemble a été mélangé puis conservé sur glace. Les tubes ont ensuite été incubés durant 15 min à 42°C puis durant 3 min à 95°C afin d'inactiver la transcriptase inverse Quantiscript. Les échantillons ont ensuite été directement utilisés pour les PCR en temps réel ou conservés à -20°C dans le congélateur.

6. Vérification de l'amplification des échantillons d'ADNc de *C. difficile* issus du fermenteur à l'aide des amorces des gènes *tcdA* et *tcdB* par PCR.

À l'aide de micropipettes, les *Master mix* (un *Master mix* pour chaque paire d'amorces) ont été préparés comme indiqué dans le tableau 4 (pour 15 réactions, 23 µL par échantillon).

Des aliquots de 23 µL ont été réalisés dans des tubes PCR. Un volume de 2 µL d'ADN extrait à amplifier (ou eau sans nucléase pour T-) a été ajouté aux tubes.

Tableau 4 : Éléments de préparation des *Master mix* pour PCR avec les amorces des gènes *tcdA* et *tcdB* sur de l'ADN extrait de *C. difficile* R20291.

	Volume ajouté (µL)
Produits	PCR
Eau sans nucléase	236.25
Amorce F 10 µM	7.5
Amorce R 10 µM	7.5
Tampon 5X	75
Hot start Taq polymérase (50 u/µL)	3.75
dNTP 10 mM	7.5
BSA (20 mg/mL)	7.5
Volume final (µL)	345

Tableau 5 : Cycle de PCR.

Paramètres expérimentales		
Pré-incubation 10 min	1 cycle	95°C
Amplification 15 sec	40 cycles	95°C
30 sec		65°C
30 sec		68°C
Refroidissement 2 min	1 cycle	20°C

Tableau 6 : Amorces ciblant les gènes *tcdA* et *tcdB* de *C. difficile* R20291.

Gène ciblé	Code	Séquence	Compagnie
<i>tcdA</i>	CDtcdA_SS.F CDtcdA_SS.R	AGC TTT CGC TTT AGG CAG TGT TAT AAA TCA AGC TAT CAG ACT CTA TGG CTG GGT TAA GGT G	Alpha DNA
<i>tcdB</i>	CDtcdB_SS.F CDtcdB_SS.R	AGC ATA TGC GGC AGC TTA TCA AGA GCA TCG TCA AAT GAC CAT AAG CTA GC CAT T	Alpha DNA

7. Visualisation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Un gel d'agarose à 1 % a été préparé (1 g d'agarose a été ajouté à 100 mL de 1X TBE). La solution a été chauffée dans un micro-onde durant 2 min afin de dissoudre complètement l'agarose. Une fois la solution refroidit, 18 µL de GelRed ont été ajoutés aux 100 mL de TBE-agarose 1%. La solution a ensuite été coulée dans un support pour électrophorèse avec un peigne, ce qui a permis d'obtenir un gel après refroidissement. Les échantillons d'ADNc ont été préparés en ajoutant 1 µL de colorant de charge 6X à 5 µL d'ADNc. Dans le premier puits, 6 µL de l'échelle d'ADN de référence ont été ajoutés. La chambre d'électrophorèse a été fermée et programmée pour fonctionner à 120 volts pendant 60 minutes. Un transilluminateur a été utilisé afin de vérifier s'il y avait eu une amplification. De l'eau sans nucléase a été utilisée comme contrôle.

8. Étude transcriptomique

L'étude RNAseq a été réalisée à la plate-forme génomique de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie de Montréal (IRIC, Montréal, Québec, Canada). Les échantillons d'ARN ont été transportés sur glace sèche, et une fois reçus, l'ARN total a été quantifié en utilisant Qubit (Thermo Scientific) et la qualité de l'ARN a été évaluée avec le 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

Les bibliothèques de transcrits ont été générées à l'aide du Kapa RNA HyperPrep (Roche, Penzberg, Allemagne) en utilisant une ribodéplétion (Qiagen). Pour ce faire, l'ARN total est hybridé avec le mélange de sondes biotinylées RiboMinus™ Pan Prokaryote ; ensuite, les complexes ARNr-sonde sont retirés de l'ARN total par capture avec des billes magnétiques RiboMinus™ conjuguées à la streptavidine. Pour une vitesse optimale, l'ARN appauvri en ARNr résultant est concentré et purifié avec des billes de liaison d'acide nucléique, fournies avec le kit RiboMinus™ Bacteria 2.0. Le séquençage a été effectué sur l'Illumina NextSeq500, obtenant environ 20 millions de lectures unilatérales par échantillon.

9. Analyse bio-informatique

Les séquences ont été éliminées de leurs adaptateurs de séquençage et les bases 3' de faible qualité à l'aide de Trimmomatic version 0.35 et aligné au génome de référence respectif de chaque espèce en utilisant STAR version 2.7.1a (Dobin *et al.*, 2013). Les séquences obtenues ont été alignées sur les génomes individuels de chacune des quatre espèces ainsi que sur un pseudo-génome composé des séquences de toutes les espèces de *C. difficile* R20291, *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2. Le pseudo génome permet de donner au logiciel d'alignement toutes les séquences qu'il est susceptible de rencontrer. En effet, lorsqu'il y a similarité de séquences et alignement avec le génome d'une seule espèce, les ARN des autres espèces vont quand même s'aligner sur le génome, souvent avec des alignements moins optimaux, ce qui augmente l'expression de ces régions de manière incorrecte. La quantification a été effectuée en utilisant HTSeq 0.13.5 (Anders *et al.* 2015) en utilisant les entrées de type "gene" à partir des fichiers convertis GFF3 pour chaque génome, en tenant compte de l'orientation des brins. Une correspondance de chaque locus TAG a été effectuée sur National Center of Biotechnology Information (NCBI) à partir du génome de *C. difficile* R20291 afin de connaître les noms des gènes dont l'expression a été modulée de façon significative. Les gènes ont ensuite été affiliés à des voies métaboliques grâce à leur séquence d'acides aminés via la plateforme KEGG de l'Université de Tokyo (KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

10. Analyse statistiques des résultats de l'étude transcriptomique

La version 1.22.2 de DESeq2 a été utilisée pour normaliser le « nombres de lectures » des gènes à partir du pseudo-génome. DESeq2 propose une normalisation par les médianes : on considère que les médianes sont les mêmes pour les deux (ou plus) échantillons comparés.

DESeq2 utilise une distribution binomiale négative pour modéliser les comptes et réalise ensuite un test d'expression différentielle qui compare l'expression pour chaque gène.

Une valeur-p est associée à chaque gène testé, elle correspond à la probabilité que la différence observée entre les conditions ne soit pas plus extrême que celle attendue sous l'hypothèse nulle de distribution identique des comptages dans les deux conditions (Love *et al.*, 2014). Les regroupements d'échantillons ont été réalisés en normalisant les logs de «nombres de lectures» (basé sur une transformation de stabilisation de la variance). Les « *hits* » non uniques ont contribué pour une fraction de l'expression à chaque emplacement.

Objectif 3. Confirmation par RT-qPCR la modulation de l'expression des gènes observée lors des essais de transcriptomique.

1. Extraction de l'ADN génomique de *C. difficile* pour la spécificité

L'ADN de *C. difficile* a été extrait grâce au kit UltraClean® Microbial (Thermo Fisher). Des échantillons de fermentations de *C. difficile* en mono-culture et en co-culture avec les souches probiotiques ont été prélevés. Les tubes contenant 1 mL de solution bactérienne ont été centrifugés 15 min à 4150 x *g*.

Un volume de 50 µL de la solution de lyse MD1 fournit par le kit ont été ajouté aux tubes, puis incubés 10 min à 65°C. La solution bactérienne et le tampon de lyse ont été transférés dans des tubes contenant des billes de verres (Sigma-Aldrich).

Les tubes contenant les billes ont été vortexés 10 min à vitesse maximum, puis ils ont été centrifugés 30 sec à 10 000 x *g*. Le surnageant a été transféré dans un nouveau microtube de 2 mL (300-350 µL de surnageant). Un volume de 100 µL de la solution MD2 fournit par le kit ont été ajouté au surnageant et incubés 5 min à 4°C. Les tubes ont été centrifugés à température ambiante 1 min à 10 000 x *g*. La quantité totale du surnageant a été transférée dans un nouveau microtube de 2 ml, le volume approximatif est de 450 µL. Un volume de 900 µL de solution MD3 fournit par le kit a été ajoutée au surnageant. L'ensemble du surnageant a été filtré dans une colonne du kit sous forme d'aliquots successifs de 700 µL centrifugés 30 sec à 10 000 x *g*. Ensuite, 300 µL de la solution MD4 fournit par le kit a été ajouté dans la colonne puis centrifugés 30 sec à 10 000 x *g*. La colonne a été placée dans un nouveau tube puis l'ensemble a été centrifugé 1 min à 10 000 x *g*. Dans un nouveau tube, 50 µL de la solution MD5 fournit par le kit a été ajouté au centre de la membrane, puis le tube a été centrifugé 30 sec à 10 000 x *g*, afin que l'ADN soit en suspension dans la solution

2. Analyse PCR quantitative de *C. difficile* R20291

2.1 Conception des amorces

Les amorces permettant l'amplification de la région souhaitée ont été conçues à l'aide de la plateforme Primer 3. La longueur des amorces sélectionnées était comprise entre 19 et 23 nucléotides. Le contenu en GC des amorces était compris entre 35 et 65%.

Les répétitions de dinucléotides (TCTCTCTCTC) et les nucléotides répétés (par exemple, TAAAAAAGC) ont été évités. Les régions complémentaires des extrémités 3' des amorces directes et inverses ont été évitées pour limiter la formation d'amorces-dimères.

Les échantillons testés sont les mêmes que ceux issus du fermenteur, utilisés lors de l'étude transcriptomique. Chaque essai comprenait des contrôles avec des échantillons sans matériel génétique et des échantillons non traités pour la transcription inverse.

2.2 Optimisation des amorces

L'optimisation des amorces a été réalisée sur les paires d'amorces des gènes : *rpoA*, *adk*, *fliC*, *fliE*, *motB*, *fliG*, *flgE*, *fliD*.

2.2.1 Gradient de température

La quantité de réactions nécessaires pour chaque paire d'amorces a été calculée afin de connaître la quantité de *Master mix* à faire. Il est recommandé d'ajouter quelques réactions pour assurer une quantité suffisante de *Master mix* pour toutes les réactions (pour tenir compte des erreurs de pipetage). Les échantillons d'ADNc ont été préparés afin d'obtenir une concentration finale de 5 ng/μL avec de l'eau sans nucléase, soit 20 ng d'ADNc par réaction (4 μL/puits). Le *Master mix* SYBR a été préparé selon le tableau 4 et le nombre de réactions calculé à l'étape 1. La «règle-de-trois» a été utilisé afin de calculer la quantité appropriée de chaque composant. Un *Master mix* devait être préparé pour chaque paire d'amorces. Le SYBR Green étant photosensible, les *Masters mix* devaient être conservé à l'abri de la lumière sur de la glace.

Tableau 7 : Composants des réactions de RT-qPCR.

Composants	[Initiale]	[Finale]	Volume (μL)/réaction
<u>SYBR Green Master mix</u>			
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)	2 X	1 X	5
Amorce Foward	10,00 μM	0,30 μM	0,3
Amorce Reverse	10,00 μM	0,30 μM	0,3
Eau sans nucléase	-	-	0,4
ADNc	5 ng/μL	2 ng/μL	4,00
TOTAL vol/puits:			10

Un volume de 4 µL d'ADNc ont été ajoutés aux 6 µL de *Master mix* en triplicata technique dans les puits désignés, la plaque été placée sur un bloc de congélation permettant de garder la plaque au frais. Dans les contrôles négatifs NTC, 4 µL d'eau sans nucléase ont été ajoutés au *Master mix* dans les puits désignés. Un volume de 4 µL des échantillons avant transcription inverse ont été ajoutés aux puits de contrôles désignés NRT (Tableau 8). Un film en plastique d'étanchéité a été ajouté sur le dessus de la plaque avant de la placer dans le thermocycleur CFX-96 (Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis) qui a été programmé selon les paramètres du Tableau 9.

Tableau 8 : Exemple de disposition des plaques pour le gradient de température des amorces du gène *fliC* de *Clostridioides difficile* R20291. La température est réglée automatiquement par le thermocycleur.

Gradients de Température							
64,0°C		A	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT
63,2°C		B	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT
61,6°C		C	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT
58,9°C		D	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT
55,5°C		E	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT
52,8°C		F	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT
50,9°C		G	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT
50,0°C		H	FliC 1	FliC 1	FliC 1	FliC 1 - NTC	FliC 1 - NRT

Tableau 9 : Paramètres de RT-qPCR pour les gradients de température.

Étapes		Nombre de Cycle	Température (°C)	Temps (min)
Dénaturation initiale (activation enzyme)		1	95	05:00
Amplification	Dénaturation	40	95	00:15
	(GRADIENT T°C)		Entre 50 et 64	00:30
	Extension		68	00:30
Courbe de Tm		1	95	00:15
			55	00:15
			95	00:15
Refroidissement		1	20	02:00

Les données ont été récupérées du CFX-96 puis elles ont été analysées avec le logiciel Bio-Rad CFX Maestro.

2.2.2 Spécificité

La spécificité des amorces a été vérifiée par BLAST (NCBI, National Center for Biotechnology Information) dans un premier temps. Elle a ensuite été évaluée par PCR afin de s'assurer que les amorces étaient spécifiques afin d'amplifier le gène de *C. difficile* et non les gènes de souches probiotiques dans les co-cultures. Des échantillons d'ADN des cultures de *C. difficile* seul mais également des trois lactobacilles seuls ont été utilisés.

La quantité de réactions nécessaires pour chaque paire d'amorces a été à nouveau calculée afin de connaître la quantité de master mix à faire. Les échantillons d'ADNg ont été préparés afin d'obtenir une concentration finale de 5 ng/μL avec de l'eau sans nucléase, soit 20 ng par réaction (4 μL/puits). Le master mix SYBR a été préparé selon le tableau 4. Un master mix a été préparé pour chaque paire d'amorces. Un volume de 4 μL d'ADNc des différentes bactéries testées (*L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2) a été ajouté aux 6 μL de master mix en triplicata technique dans les puits désignés. L'ADNc de *C. difficile* était utilisé comme contrôle positif. Les contrôles négatifs NTC contenaient 4 μL d'eau sans nucléase (Tableau 8). Un film en plastique d'étanchéité a été ajouté sur le dessus de la plaque avant de la placer dans le thermocycleur CFX-96 qui été réglé selon les paramètres du tableau 5. Les données ont été récupérées du CFX-96 puis elles ont été analysées avec le logiciel Bio-Rad CFX Maestro.

Tableau 10 : Exemple de disposition des plaques des essais de spécificité des amorces de *Clostridioides difficile* R20291 avec *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2.

A	<i>L. acidophilus</i> CL1285	<i>L. casei</i> LBC80R	<i>L. rhamnosus</i> CLR2
B	<i>L. acidophilus</i> CL1285	<i>L. casei</i> LBC80R	<i>L. rhamnosus</i> CLR2
C	<i>L. acidophilus</i> CL1285	<i>L. casei</i> LBC80R	<i>L. rhamnosus</i> CLR2
D			
E	NTC	NTC	NTC
F			
G	Pos Ctrl	Pos Ctrl	Pos Ctrl
H	<i>C. difficile</i> R20291	<i>C. difficile</i> R20291	<i>C. difficile</i> R20291

2.2.3 Stabilité

Un gène de référence est un gène qui est exprimé dans toutes les cellules. En effet, le gène qui code pour la protéine doit jouer un rôle essentiel à la vie de la cellule. Ce gène est soumis à une sélection purifiante (les mutations sont éliminées) et on le retrouve dans de nombreux organismes dont la séquence est conservée et spécifique à un organisme, et dont l'expression ne varie pas ou très peu, et qui peut servir d'échelle pour mesurer une expression de gènes afin d'avoir une donnée d'expression relative. Un exemple est le gène 16s qu'on trouve dans les bactéries et les mitochondries.

Ces gènes sont utilisés pour les programmes de "*barcoding*" (identification d'organismes) (Kozera & Rapacz, 2013).

La stabilité des gènes de références est un paramètre essentiel dans l'optimisation de la RT-qPCR. Il est important que les gènes de référence de *C. difficile* soient stables dans diverses conditions de culture (monoculture versus co-culture avec les souches probiotiques) afin de fournir des résultats d'amplification similaires d'une condition à l'autre. Le thermocycleur CFX-96 a été réglé selon les paramètres du tableau 5. La valeur M est calculée par une moyenne géométrique de tous les gènes de référence utilisés dans l'étude et la variation moyenne par paire d'un gène de référence à partir d'autres gènes de référence, elle a été calculée automatiquement par le logiciel CFX Maestro (Bansal *et al.*, 2015).

2.2.4 Efficacité

L'efficacité de la PCR dépend du dosage, des performances du *Master mix* et de la qualité de l'échantillon. Généralement, un rendement compris entre 90 et 110 % est considéré comme acceptable. Lors de l'évaluation de l'efficacité des amorces, il est important de prendre en compte le R^2 , il permet d'indiquer à quel point une valeur est acceptable pour en prédire une autre. Lorsque le R^2 est égal à 1, la valeur de Y (Ct) peut être utilisée pour prédire avec précision la valeur suivante. Si R^2 est 0, la valeur de X ne peut pas être prédite à partir de la valeur de Y.

Une valeur de $R^2 > 0,99$ est considérée comme fiable dans la corrélation de deux valeurs (Ruijter *et al.*, 2021). La quantité de réactions nécessaires pour chaque paire d'amorces a été calculée afin de connaître la quantité de *Master mix* à préparer selon le tableau 4. La dilution en série a été préparée en diluant le stock d'ADNc (5 ng/ μ L) avec de l'eau sans nucléase en suivant le modèle du tableau 7. La quantité d'ADNc (4 μ L/réaction) nécessaire pour chaque dilution a été calculée.

Un volume de 4 μL d'ADNc des différentes dilutions ont été ajoutés aux 6 μL de *Master mix* en triplicatas techniques dans les puits désignés. Les contrôles négatifs NTC renferment 4 μL d'eau sans nucléase, ils ont été ajoutés au *Master mix* dans les puits désignés et 4 μL des échantillons avant transcription inverse ont été ajoutés aux puits de contrôles désignés NRT. Un film en plastique d'étanchéité a été ajouté sur le dessus de la plaque avant de la placer dans le thermocycleur CFX-96 qui été réglé selon les paramètres du tableau 5. Les données ont été récupérées du CFX-96 puis elles ont été analysées avec le logiciel Bio-Rad CFX Maestro.

Tableau 11 : Exemple de dilutions de l'ADNc des essais d'efficacité des amorces de *Clostridioides difficile* R20291.

	Dilution	[ADNc] (ng/uL)	ADNc/réaction (ng)
A	ND	5	20
B	10^{-1}	0,5	2
C	10^{-2}	0,05	0,2
D	10^{-3}	0,005	0,02
E	10^{-4}	0,0005	0,002
F	10^{-5}	0,00005	0,0002
G	10^{-6}	0,000005	0,00002
H	10^{-7}	0,0000005	0,000002

3. Analyse bio-informatique des résultats de RT-qPCR

Le niveau d'expression de chaque gène sélectionné et les conditions de PCR ont été déterminés en utilisant la méthode de quantification relative telle que décrite par (Yun *et al.*, 2014).

Résultats

III. Résultats

Objectif 1 : Confirmation de l'effet anti-toxines des souches probiotiques

1. Validation des cycles de stérilisation

1.1 Croissance bactérienne

Des échantillons issus des fermentations de *C. hylemonae* ont été prélevés avant la décontamination du fermenteur. Le but était d'observer si la bactérie avait bien poussée dans le milieu. Aucune gamme de dilution n'a été effectuée, les dénombrements ont permis d'observer un nombre élevé de cellules végétatives sur les géloses BHI avant la décontamination (>1000 par gélose). Après la décontamination, des dénombrements ont été effectués sur des échantillons issus de la cuve et des tubulures, aucune cellule végétative n'a été observée. Des échantillons issus des fermentations de *C. difficile* ont également été prélevés avant la décontamination du fermenteur. Les dénombrements ont permis d'observer un nombre élevé de cellules végétatives sur les géloses BHI avant la décontamination (>1000 par gélose). Après la décontamination, aucune colonie n'a été observée.

1.2 Croissance de spores

Des échantillons ont été prélevés après les essais de fermentation de *C. hylemonae*, placées en contact de dioxygène et d'éthanol pur, les cellules ont sporulées. Les spores ont ensuite été placées sur des milieux favorisant la germination des spores puis les cellules végétatives ont pu être dénombrées. Les valeurs de dénombrement de cellules végétatives de *C. hylemonae* sur les milieux germinatifs étaient de $2.47 \log_{10}$ UFC/mL en moyenne avant la décontamination. Les géloses utilisées pour les dénombrements de cellules végétatives issus de spores après la décontamination ne présentaient aucune colonie, de même que pour les géloses de CCFA utilisées comme contrôle. Des échantillons ont également été prélevés à la suite de la fermentation de *C. difficile*. Les valeurs de dénombrement de cellules végétatives de *C. difficile* sur le milieu germinatif étaient de $2.36 \log_{10}$ UFC/mL en moyenne avant la décontamination, aucune colonie n'a été observé sur les géloses de contrôle CCFA. Aucune colonie n'a été observée sur le milieu germinatif après la décontamination du fermenteur ce qui prouve l'efficacité du cycle de décontamination utilisé dans l'élimination des cellules végétatives et des spores de *C. difficile*.

2. Croissance bactérienne en fermenteur

La croissance de *C. difficile* a été quantifiée dans le fermenteur en mono-culture et co-culture avec les trois souches probiotiques (Figure 6). *C. difficile* s'est bien développé dans le milieu BHI, avec une moyenne de croissance bactérienne de 8.76 log₁₀ UFC/mL après 12 h et 8.16 log₁₀ UFC/mL après 24 h en mono-culture (Figure 7). En co-culture avec les lactobacilles, la croissance de *C. difficile* n'a pas statistiquement été affecté avec une moyenne de croissance bactérienne de 8.41 log₁₀ CFU/mL après 12 h et 8.1 log₁₀ UFC/mL après 24 h (Figure 6). Il n'y a pas de différence statistiquement significative pour la croissance de *C. difficile* entre la mono-culture et la co-culture après 12h et 24h. La croissance des trois souches probiotiques a également été quantifiée en présence et en absence de *C. difficile*. Les lactobacilles ont crû dans le milieu BHI avec une moyenne de croissance bactérienne de 8.84 log₁₀ UFC/mL après 12 h et de 8.6 log₁₀ UFC/mL après 24 h dans une culture exempte de *C. difficile* (Figure 7). En co-culture avec *C. difficile*, les souches probiotiques ont eu une croissance similaire, avec une moyenne de bactérie de 8.81 log₁₀ UFC/mL après 12 h et de 8.6 log₁₀ UFC/mL après 24 h (Figure 7), sans différence de croissance statistiquement significative pour les lactobacilles après 12 h et 24 h de culture en fermenteur en présence ou absence de *C. difficile*.

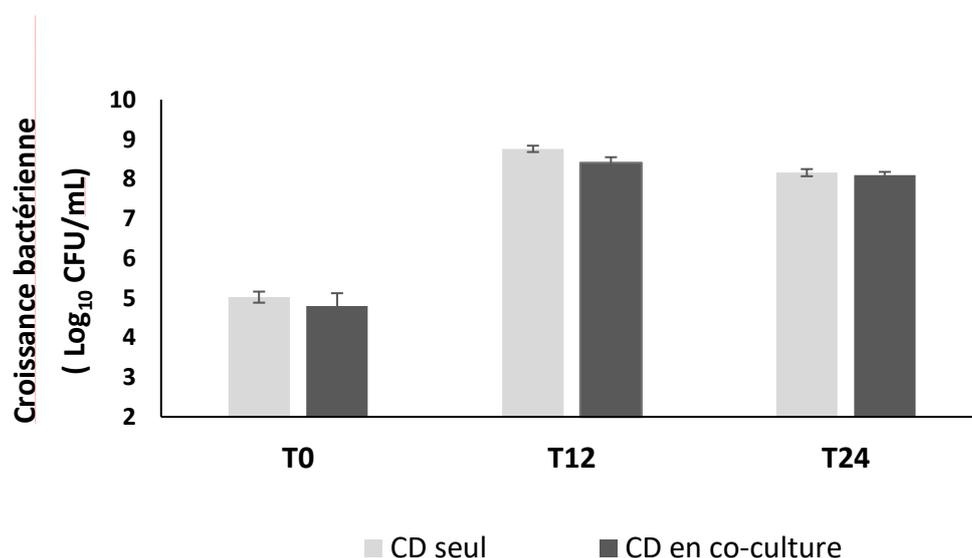


Figure 6 : Suivi de la croissance de *Clostridioides difficile* R20291 en fermenteur, cultivé seul ou en présence de *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 dans un milieu BHI avec contrôle du pH.

La croissance de *C. difficile* a été mesurée sur des géloses Cycloserine-Cefoxitin Fructose (CCFA) dans des conditions anaérobies puis incubées 48 h à 37°C. Les résultats présentés sont la moyenne des réplicats biologiques de 3 expérimentations indépendantes (n=3).

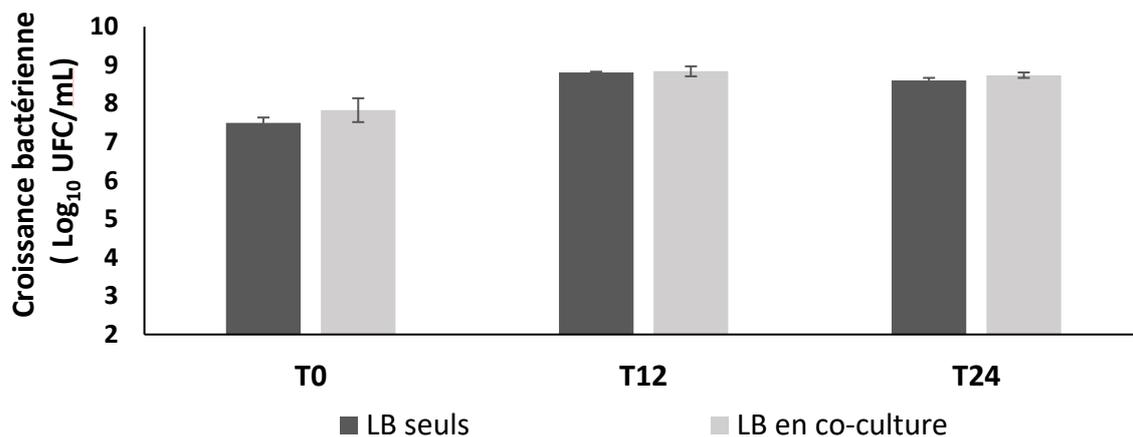


Figure 7 : Suivi de la croissance de *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* *Clostridioides* en fermenteur, cultivés seuls ou en présence de *Clostridioides difficile* R20291 dans un milieu BHI avec contrôle du pH.

La croissance des trois lactobacilles a été mesurée sur des géloses de Man Rogosa Sharpe (MRS) dans des conditions anaérobies puis incubées 48 h à 37°C. Les résultats présentés sont la moyenne des réplicats biologiques de 3 expérimentations indépendantes (n=3). Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards des moyennes. Anova unidirectionnel avec test de comparaison multiple Tukey : *P ≤ 0,05. Les valeurs de la croissance des *Lactobacillus* spp. après 12 h en présence de *C. difficile* ne sont pas significativement différentes des valeurs de croissance des cultures sans *C. difficile* (p>0.05).

3. Production de toxines A et B

Les valeurs des concentrations de toxines A et B ont été normalisées. La toxine A était concentrée à hauteur de $2,12E-08 \pm 4,2E-09$ ng/UFC en moyenne après 12 h en monoculture.

Les concentrations des toxines A et B étaient inférieures à la limite de quantification du kit ELISA (≤ 1.25 ng/mL) pour les co-cultures avec les souches probiotiques, mais également pour la toxine B en mono-culture après 12h.

Après 24h, les concentrations de toxine A étaient en moyenne de $3,36E-07 \pm 5,6E-08$ ng/UFC en monoculture et de $1,75E-07 \pm 3,9E-08$ ng/UFC en co-culture (Figure 8). Toujours après 24h, les concentrations de toxine B étaient en moyenne de $1,48E-07 \pm 5,10E-08$ ng/UFC en monoculture et de $1,21E-07 \pm 2,8E-08$ ng/UFC en co-culture (Figure 8).

Ainsi, en présence des souches *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2, il y a eu une réduction statistiquement significative de la production de toxine A de 48% ($p \leq 0.05$). Cependant la présence des souches probiotiques n'affecte pas significativement la production de toxine B ($p > 0.05$). Des résultats similaires ont été observés dans les trois répétitions.

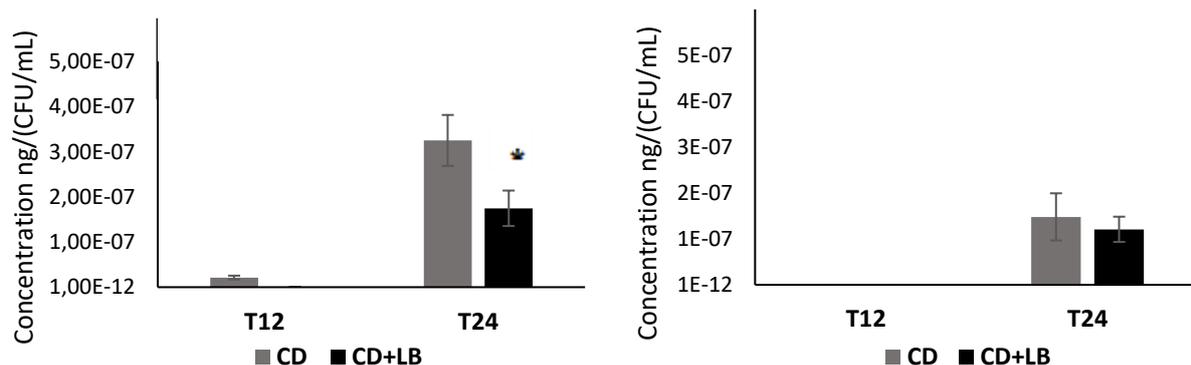


Figure 8 : Suivi de la sécrétion des toxines A et B exprimé en ng/UFC après 24 h dans un bioréacteur inoculé avec *Clostridioides difficile* R20291 avec ou sans *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 dans un milieu BHI avec contrôle du pH.

La sécrétion des toxines a été mesurée par la méthode ELISA. Les résultats présentés sont la moyenne des réplicats biologiques de 3 expérimentations indépendantes ($n=3$). Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards des moyennes. Anova unidirectionnel avec test de comparaison multiple Tukey : $*P \leq 0,05$. Une réduction statistiquement significative ($p \leq 0.05$) de la toxine A en co-culture avec les souches probiotiques après 24 h est observable.

La Figure B représente la réduction non statistiquement significative ($p > 0.05$) de la toxine B en co-culture après 24 h.

Objectif 2 : Évaluation de l'impact de la co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques sur l'expression de l'ensemble des gènes de *C. difficile* par transcriptomique.

1. Expression des gènes de toxines

Afin de réaliser l'étude transcriptomique, des échantillons d'ADNc issus des essais de fermentations ont été extraits. Cette expérience avait pour but de confirmer que les gènes de toxines dont *tcdA* et *tcdB* étaient bien exprimés dans le modèle dans les cultures de *C. difficile* mais également dans les co-cultures avec les souches probiotiques. Ces deux gènes étaient bien exprimés après 12 h de culture en fermenteur dans un milieu BHI en présence et en l'absence des souches probiotiques (Figure 9). Les gènes de toxines ne sont bien sûr pas exprimés dans les co-cultures des trois souches probiotiques sans *C. difficile*.

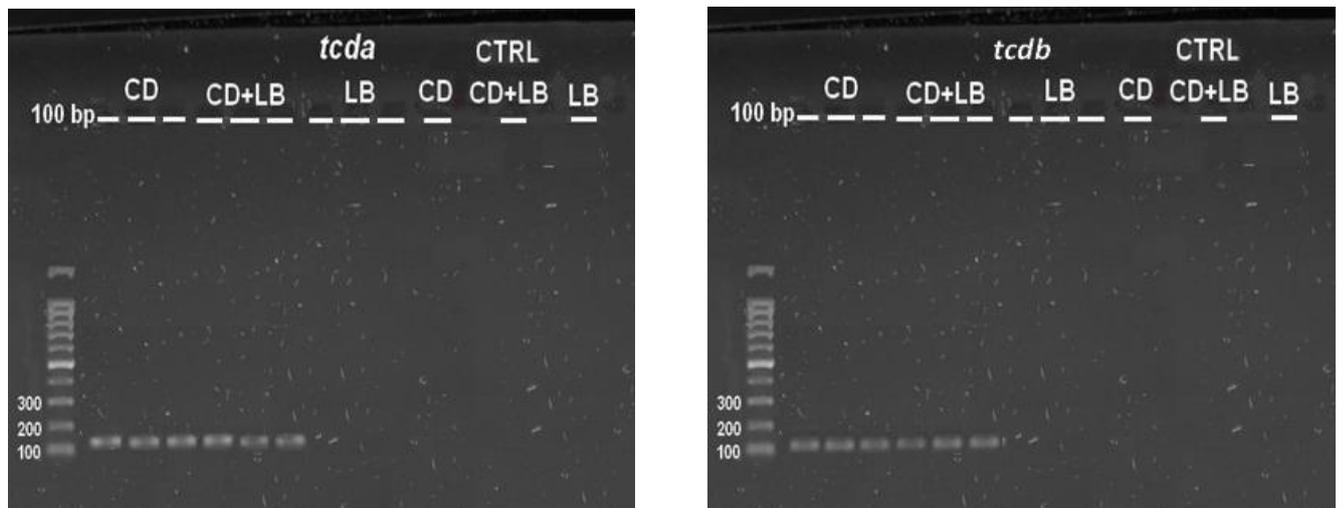


Figure 9 : Visualisation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADNc traité à la DNase de *Clostridoides difficile* R20290 (CD) cultivé seul et en co-culture durant 12h avec *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 (LB).

La première ligne représente le marqueur de poids moléculaires. Le poids moléculaire des quatre bandes les plus basses du marqueur a été ajouté sur la figure. Les gènes *tcdA* et *tcdB* sont bien exprimés dans ce modèle après 12 h de fermentation dans un milieu BHI.

2. Modulation de l'ensemble des gènes de *C. difficile* R20291

Des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur des monocultures de *C. difficile* et des co-cultures de *C. difficile* en présence des trois lactobacilles probiotiques afin d'explorer les différences d'expression de gènes. Au cours du processus d'extraction de l'ARN, il a été constaté que le nombre d'intégrité de l'ARN (RIN) diminuait à mesure que le temps de traitement augmentait, ce qui suggère que la dégradation de l'ARN total des cellules de *C. difficile* était substantielle au cours du temps. Ce phénomène a été retrouvé dans les groupes avec et sans probiotiques. Pour les échantillons procaryotes, un RIN supérieur à 7,0 peut être accepté (RIN \geq 7.0) (Yang & Yang, 2020). Des changements de RIN sous différents temps de traitement ont été observés (3, 6, 12, 24 et 48 h) les RIN des échantillons d'ARN provenant de cultures de 12 h ont été acceptés car ils étaient tous supérieurs à 7 (Figure 10). Les échantillons d'ARN étaient exempts de dégradation et de contaminants résiduels tels que les tampons et les sels provenant du processus d'extraction (Figures 11 et 12). Il s'agissait d'une étape fondamentale avant l'étape de séquençage de l'ARN afin de s'assurer d'avoir des lectures de bonne qualité.

Le package DESeq2 (version 1.22.2) a été utilisé pour analyser les différences d'expression génique ($\log_2 |fold\ change| > 1$, $P\text{-value} \leq (0,05)$), 1156 gènes ont été différentiellement exprimés (GDEs), incluant 620 gènes sous-exprimés et 536 gènes surexprimés dans les co-cultures de *C. difficile* avec les souches probiotiques. Parmi ces GDEs, 223 étaient au moins quatre fois plus exprimés et 268 étaient au moins quatre fois moins exprimés dans les co-cultures par rapport aux monocultures. Afin d'analyser les fonctions des GDEs chez *C. difficile*, une analyse d'enrichissement KEGG a été réalisée. Cette analyse a permis de catégoriser les GDEs dans différentes voies, en utilisant des bases de données bio-informatiques, comprenant 11 catégories fonctionnelles.

Parmi l'ensemble des gènes dont l'expression a été modulée, 20 % appartenait à la catégorie de traitement de l'information génétique, 17% au métabolisme des glucides, 16% à la signalisation et aux processus cellulaires, 12% au métabolisme non classifié, 10% au traitement de l'information environnemental, 7% au métabolisme des acides aminés, 6% au métabolisme de co-facteurs et vitamines, 5% au métabolisme énergétique, 4% au métabolisme des nucléotides, 2% au métabolisme des lipides et 1% à la pathogénicité.

Parmi les gènes surexprimés, 8% appartiennent à la catégorie traitement de l'information génétique, 13% au métabolisme des glucides, 22% à la signalisation et aux processus cellulaires, 15% au métabolisme non classifié, 18% au traitement de l'information environnementale, 4% au métabolisme des acides aminés, 7% au métabolisme de co-facteurs et vitamines, 8% au métabolisme énergétique, 1% au métabolisme des nucléotides et 4% au métabolisme des lipides.

Parmi l'ensemble des gènes sous-exprimés observés, 24% appartiennent à la catégorie traitement de l'information génétique, 17% au métabolisme des glucides, 18% à la signalisation et aux processus cellulaires, 5% au métabolisme non classifié, 12% traitement de l'information environnemental, 10% au métabolisme des acides aminés, 4% au métabolisme de co-facteurs et vitamines, 3% au métabolisme énergétique, 3% au métabolisme des nucléotides, 2% au métabolisme des lipides et 1% à la pathogénicité.

En prenant en considération seul les gènes surexprimés au moins quatre fois par rapport aux monocultures de *C. difficile*, 9 proviennent de la catégorie métabolisme des nucléotides, 2 à la pathogénicité, 3 au métabolisme des lipides, 8 au métabolisme des acides aminés, 29 à la signalisation et aux processus cellulaires, 48 au métabolisme non classifié, 33 à l'information génétique, 18 au métabolisme des co-facteurs et vitamines, 17 au métabolisme énergétique, 16 à l'information environnementale et 39 au métabolisme des glucides.

Il est à noter que parmi les gènes sous-exprimés au moins quatre fois par rapport aux monocultures, 8 proviennent de la catégorie métabolisme des nucléotides, 5 à la pathogénicité, 6 au métabolisme des lipides, 27 au métabolisme des acides aminés, 49 à la signalisation et aux processus cellulaires, 13 au métabolisme non classifié, 63 au traitement de l'information génétique, 10 au métabolisme des co-facteurs et vitamines, 8 au métabolisme énergétique, 33 au traitement de l'information environnemental et 45 au métabolisme des glucides (Figure 13).

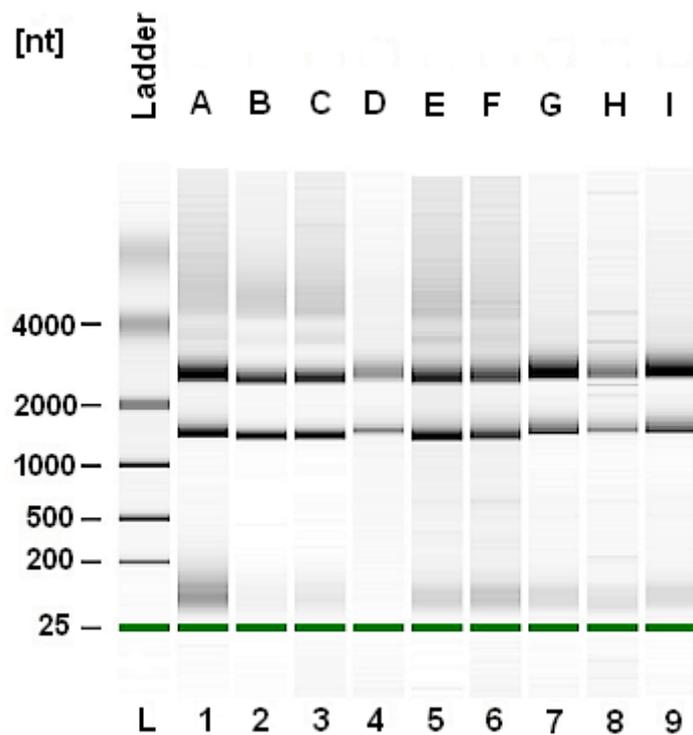


Figure 10 : Visualisation après migration par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant, de l'extraction d'ARN provenant des échantillons des cultures de *Clostridioides difficile* R20291 seul (A, B, C), des co-cultures de *C. difficile* R20291 et de *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (D, E, F) et des co-cultures des Lactobacilles seuls (G, H, I) après 12 h en milieu BHI.

La première ligne représente le marqueur de poids moléculaires.

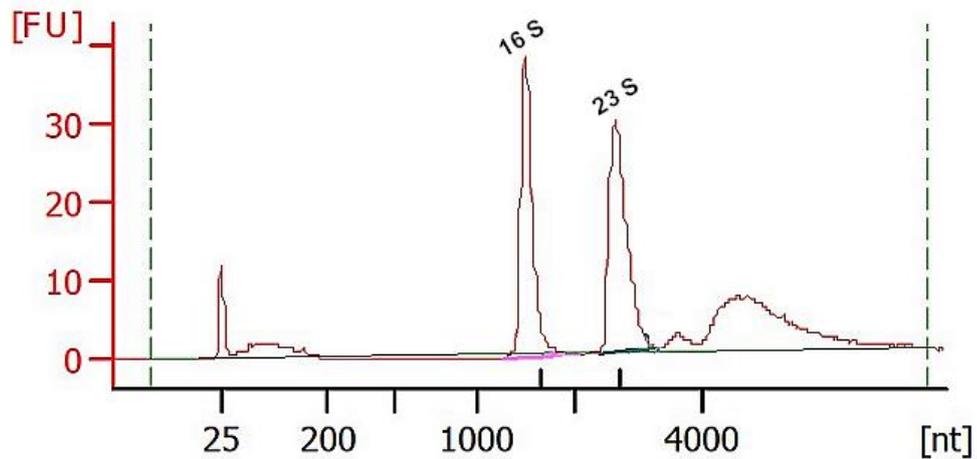


Figure 11 : Chromatogramme représentatif de la qualité des échantillons de l'ARN extrait de *Clostridioides difficile* R20291 cultivé seul pendant 12 h dans un fermenteur à 37 ° C dans un milieu BHI analysé avec un bioanalyser. [FU] indique l'unité de fluorescence.

Le RIN est de 10. Les ARNr 16S et 23S peuvent être identifiés par les deux bandes à 1500 pb et 3000 pb.

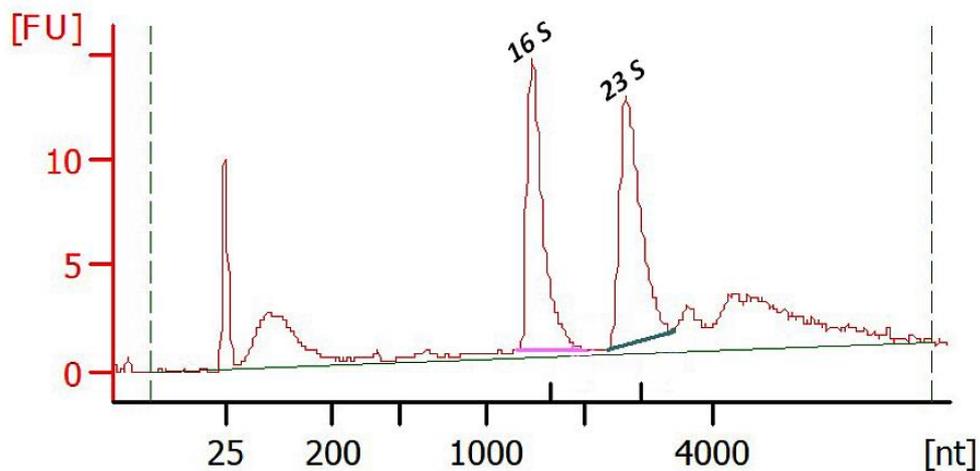
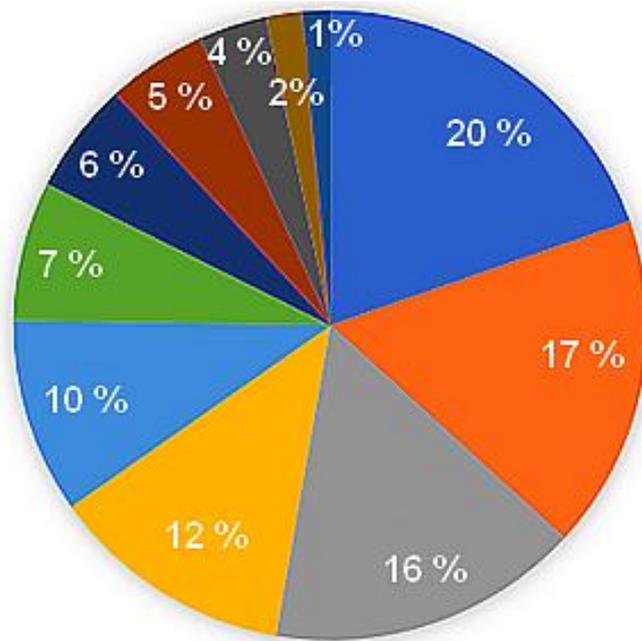


Figure 12 : Chromatogramme représentatif de la qualité de l'ARN extrait de *Clostridioides difficile* R20291 cultivé en présence des souches probiotiques *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lacticaseibacillus casei* LBC80R, *Lacticaseibacillus rhamnosus* CLR2 pendant 12 h dans un fermenteur à 37 ° C dans un milieu BHI analysé avec un bioanalyser. Le RIN est de 9,9. [FU] indique l'unité de fluorescence.

Les ARNr 16S et 23S peuvent être identifiés par les deux bandes à 1500 pb et 3000 pb.



- | | |
|---|--|
| ■ Traitement de l'information génétique | ■ Métabolisme co-facteurs et vitamines |
| ■ Métabolisme des glucides | ■ Métabolisme énergétique |
| ■ Signalisation et aux processus cellulaires | ■ Métabolisme des nucléotides |
| ■ Métabolisme non classifié | ■ Métabolisme des lipides |
| ■ Métabolisme des acides aminés | ■ Pathogénicité |
| ■ Traitement de l'information environnementale | |

Figure 13 : Diagramme en tarte représentant les onze catégories regroupant l'ensemble des gènes de *Clostridioides difficile* R20291 dont l'expression a été modulée en fermenteur dans un milieu BHI après 12 h en présence des souches probiotiques *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactocaseibacillus casei* LBC80R, *Lactocaseibacillus rhamnosus* CLR2.

Les résultats présentés sont la moyenne des réplicats biologiques de 3 expérimentations indépendantes (n=3). DESeq2 et Anova unidirectionnel avec test de comparaison multiple Tukey : *P ≤ 0,05.

CD vs CD+LB

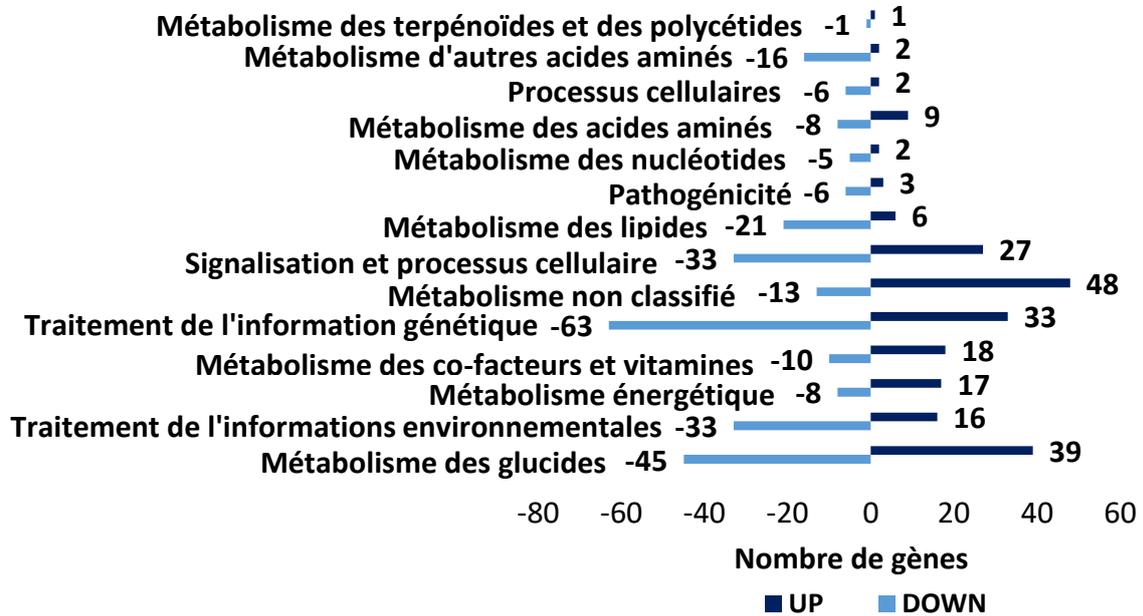


Figure 14 : Diagramme de Kegg représentant les onze catégories regroupant le nombre des gènes de *Clostridioides difficile* R20291 dont l'expression a été sur ou sous-exprimée au moins 4 fois en présence des souches probiotiques *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lacticaseibacillus casei* LBC80R, *Lacticaseibacillus rhamnosus* CLR2 en fermenteur après 12 h dans un milieu BHI.

Les résultats présentés sont la moyenne des répliques biologiques de 3 expérimentations indépendantes (n=3). DESeq2 et Anova unidirectionnel avec test de comparaison multiple Tukey : *P ≤ 0,05.

2.1 Résultats d'expression des gènes de l'étude transcriptomique

Les gènes ayant été les plus surexprimés dans les co-cultures encodent une protéine hypothétique CDIF27147_RS06770, EutN, EutM, la sensor *histidine kinase*, et la *sulfite reductase sous-unité C*. Le gène qui code pour la protéine hypothétique a été surexprimé de 4.9 log₂ fois en co-cultures (Annexe 1). Le gène qui code pour la protéine EutN a été surexprimé de 4.3 log₂ fois et EutM 4.3 log₂ fois en co-cultures, (Annexe 1). Le gène qui code pour la *sensor histidine kinase* a été surexprimé de 5.1 log₂ fois (Annexe 1). On note également une surexpression de plus de 4.4 log₂ du gène qui code pour la *sulfite reductase sous-unité C* (Annexe 1).

Les gènes ayant été les plus sous-exprimés en co-cultures encodent une protéine hypothétique CDIF27147_RS06770, UxaA, KdgT, PTS *sugar transporter subunit IIA*, *DHHW protein family*, et MobA/MobL. La protéine hypothétique a été sous-exprimée de -5.2 log₂ fois en co-cultures (Annexe 1). Le gène qui code pour la protéine UxaA a été sous-exprimé de -5.7 log₂ fois en co-cultures (Annexe 1), il s'agit de l'altronate déhydratase. Le gène qui code pour la protéine KdgT a été sous-exprimé de -5.8 log₂ fois (Annexe 1). KdgT est une perméase 2-céto-3-désoxygluconate qui transporte les produits de pectine dégradés dans la cellule bactérienne. Le gène qui code pour la protéine PTS *sugar transporter subunit IIA* a été sous-exprimé de -5.4 log₂ fois, puis, le gène qui code pour la protéine DHHW a lui été sous-exprimé de -5.3 log₂ fois en présence des Lactobacilles (Annexe 1). Enfin, le gène qui code pour la protéine MobA a été sous-exprimé -6.6 log₂ fois (Annexe 1). Le gène MobA code pour une protéine qui est essentielle pour le transfert de plasmide spécifique (Meyer, 2009).

2.1.1 Gènes de toxines

Aucune modulation de l'expression des gènes présents sur le PaloC n'a été observée en présence des souches probiotiques par rapport à la croissance de *C. difficile* en mono-culture. Cependant, le gène *cdtA* de la toxine binaire CDT a été surexprimé de 1.75 log₂ et *cdtB* de 2.36 log₂ fois en présence des lactobacilles (Annexe 3).

Une valeur de +2 log₂ indique que le gène est 4 fois plus exprimé en co-culture tandis qu'une valeur de -2 indique qu'il est 4 fois moins exprimé (Yang & Yang, 2020).

2.1.2 Gènes de motilité

Dans les co-cultures de *C. difficile* avec les souches probiotiques, l'ensemble des gènes de motilité dont l'expression a été modulée ont été sous-exprimés. Dans cette étude, le gène *FliC* de *C. difficile* a été sous-exprimé de $-2,36 \log_2$ fois en co-cultures, il s'agit du principal monomère structurel de la flagelline (Péchiné *et al.*, 2005) (Annexe 7). Le gène *FliE*, qui code pour la protéine du complexe flagellaire du corps crochet-basal, a été sous-exprimé de $-1,47 \log_2$ fois en présence des lactobacilles (Annexe 7). Les gènes qui codent pour les protéines FliI et FliH ont été respectivement sous-exprimés de $-1,40 \log_2$ et $-1,41 \log_2$ fois dans les co-cultures (Annexe 7). Le gène qui code pour la protéine FliJ, composant général de l'appareil d'exportation flagellaire, a été sous-exprimé de $-1,30 \log_2$ fois en co-cultures (Annexe 7) (Minamino *et al.*, 2000). FlgB et FlgC sont des protéines du corps basal flagellaire et constituent une partie majeure de l'organite flagellaire ; ils ont également été respectivement sous-exprimés de $-1,29 \log_2$ et $-1,01 \log_2$ fois en co-cultures (Annexe 7). Le gène *fliK* qui code pour la protéine contrôlant la longueur des crochets flagellaires a également été sous-exprimé de $-1,35 \log_2$ fois (Annexe 7) (Ryan *et al.*, 2005).

La capacité de nager peut aider des bactéries à chercher des éléments nutritifs et à coloniser un environnement, cette capacité est réalisée grâce au moteur rotatoire flagellaire. FliG, MotA et MotB sont des protéines de rotation du moteur flagellaire (Tasteyre *et al.*, 2001a). Le gène *fliG* a été sous-exprimé de $-1,26 \log_2$, *motA* de $-1,03 \log_2$ et *motB* de $-0,97 \log_2$ fois (Annexe 7). Le corps basal constitue lui aussi une partie importante de l'organite flagellaire. Il se compose de quatre anneaux (L, P, S et M) montés sur une tige centrale (Aubry *et al.*, 2012). Dans l'étude, le gène *fliF* de *C. difficile* qui code pour la protéine flagellaire de l'anneau M a été sous-exprimé de $-1,87 \log_2$ fois en présence des lactobacilles (Annexe 7) (Fan *et al.*, 1997).

FliP est une protéine responsable des pores du système de sécrétion flagellaire de type III. Dans l'étude, le gène qui code pour cette protéine a été sous-exprimé de $-0,87 \log_2$ fois en présence des souches probiotiques (Annexe 7) (Fan *et al.*, 1997). Enfin, les gènes qui codent pour les protéines flagellaires FliT et FliD ont également été respectivement sous-exprimés de $-1,66 \log_2$ et $-1,11 \log_2$ fois en co-cultures (Annexe 7).

2.1.3 Gènes de sporulation

L'étude transcriptomique réalisée sur les échantillons issus des fermentations a permis de mettre en évidence les gènes liés à la sporulation qui ont été modulés en présence des lactobacilles. Le gène *spoOA* a été surexprimé de 1,05 log₂ fois en présence des souches probiotiques (Annexe 5). Le gène *spoIVA* qui code pour la protéine morphogénétique essentielle pour le développement précoce des spores (Putnam *et al.*, 2013) est également surexprimé de 4,12 log₂ fois en présence des lactobacilles (Annexe 5).

Le gène qui code pour SigH a été surexprimé de 1.09 log₂ fois en présence des lactobacilles. Le gène *SpoVS* de *C. difficile* qui code pour la protéine spoVS requise pour la déshydratation du noyau (Antunes *et al.*, 2012) a été surexprimé de 1,02 log₂ fois en présence des lactobacilles (Annexe 5). Les gènes qui codent pour la protéine SpoVE et les lyases de photoproduits de spores de *C. difficile* ont également été surexprimés à hauteur de 0,62 et 0,8 log₂ fois, respectivement (Annexe 5) (Figure 3) (Theeragool *et al.*, 1993). Le gène *yqfD*, lié à la résistance à la chaleur de la spore et à la formation du cortex a été sous-exprimé de -1,09 log₂ fois en présence des souches probiotiques (Annexe 5) (Saujet *et al.*, 2013).

Le gène qui code pour la protéine SpoIIE contribue au passage de la division cellulaire médiale à la division polaire au cours de la sporulation a également été sous-exprimé de -1.63 log₂ fois (Annexe 5) (Wu *et al.*, 1998). Le gène qui code pour la protéine SpoVT a été sous-exprimé de -3.62 log₂ fois (Annexe 5), il a un impact majeur sur la germination et la résistance des spores résultantes. Le gène *cotJA* de *C. difficile* a également été sous-exprimé de -2.53 log₂ fois (Annexe 5) en présence des souches probiotiques.

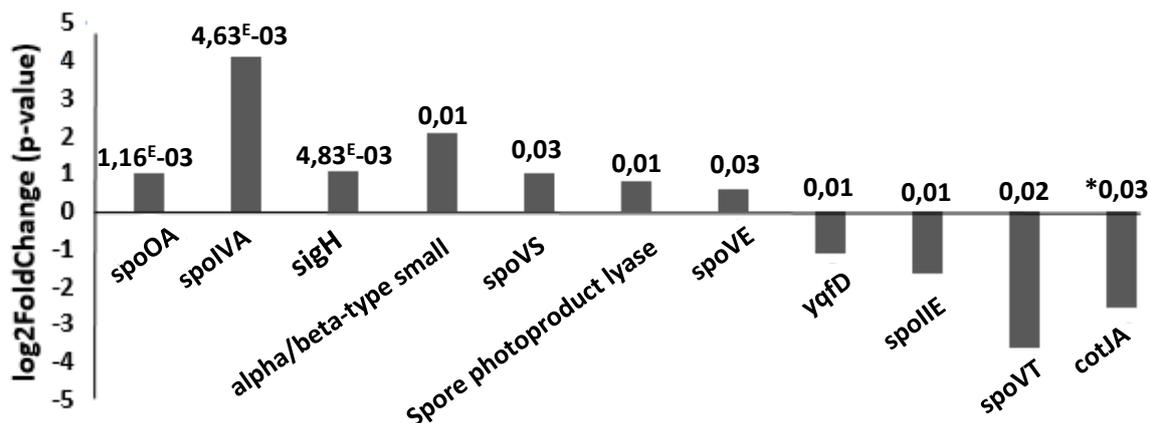


Figure 15 : Niveau d'expression des gènes liés à la sporulation de *Clostridioides difficile* R20291 en co-culture avec *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2. Les résultats présentés sont la moyenne des réplicats biologiques de 3 expérimentations indépendantes (n=3).

Les barres d'erreur indiquent les erreurs standards des moyennes. DESeq2 et Anova unidirectionnel avec test de comparaison multiple Tukey : *P ≤ 0,05.

2.1.4 Gènes liées au QS

Comme beaucoup de bactérie, *C. difficile* possède l'enzyme métabolique LuxS qui participe à la détoxification des S-adénylhomocystéine pendant le cycle de la méthionine. Tout en catalysant la réaction des S-ribosylhomocystéine en homocystéine, LuxS produit du 4,5-dihydroxy-2,3 pentanedione (DPD) (Slater *et al.*, 2019). Le gène *luxS* a été sous-exprimé de -1,60432 log₂ fois en présence des souches probiotiques (Annexe 4).

Lors des essais de fermentation, les gènes CDIF27147_RS12455 et CDIF27147_RS11690 qui codent pour deux autoinducteurs de type 2 de *C. difficile* R20291 ont été légèrement surexprimés en co-cultures en présence des trois souches probiotiques. L'expression de CDIF27147_RS12455 était de 0.92 log₂ fois et celle de CDIF27147_RS11690 de 1.02 log₂ fois par rapport aux mono-cultures (Annexe 4).

2.1.5 Gènes d'adhésion

Le gène *cwp8* a été sous-exprimé de 2,05 log₂ fois en co-cultures. Cependant 11 autres gènes de paroi cellulaire *cwp* ont été surexprimés entre -0,6 et -2,08 log₂ fois en présence des souches probiotiques (Annexe 6).

2.1.6 Protéines chaperonnes

La protéine GroEL est nécessaire pour le repliement efficace de nombreuses protéines et est également impliquée dans l'adhérence de *C. difficile* (Hennequin *et al.*, 2001b). Le gène qui code pour la protéine GroEL a été sous-exprimé de -1.0 log₂ fois en co-cultures (Annexe 2). La protéine GrpE (Gro-P) est un facteur d'échange de nucléotides bactérien important pour la régulation de la machinerie de repliement des protéines, ainsi que pour la réponse au choc thermique. C'est une protéine inductible par la chaleur et pendant le stress, elle empêche les protéines dépliées de s'accumuler dans le cytoplasme (Delaney, 1990). Le gène qui code pour la protéine GrpE a été sous-exprimé de -1,57 log₂ fois en présence des probiotiques (Annexe 2).

Un autre gène, le gène *htpG*, a été sous-exprimé de -1,66 log₂ fois avec les Lactobacilles (Annexe 2). La protéine HtpG est impliquée dans la protection des cellules contre divers stress environnementaux (Hennequin *et al.*, 2001b) et peut former des complexes avec d'autres protéines bactériennes, notamment celles impliquées dans des fonctions fondamentales (Thomas & Baneyx, 1998). Le chaperon moléculaire bactérien DnaK est une enzyme qui couple les cycles de liaison d'ATP, d'hydrolyse et de libération d'ADP par un domaine d'hydrolyse d'ATP N-terminal à des cycles de séquestration et de libération de protéines dépliées (Cyr *et al.*, 1994). Le gène *dnaK* a été sous-exprimé de -1,29 log₂ fois en présence des souches probiotiques (Annexe 2). DnaJ joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réplication de l'ADN du phage lambda, où il agit de manière dépendante de l'ATP avec la protéine DnaJ pour libérer les protéines lambda O et P du complexe préprimosomal (Cheetham & Caplan, 1998). Le gène *dnaK* a été sous-exprimé de -1,37 log₂ fois en présence des souches probiotiques (Annexe 2).

2.1.7 Systèmes de transport

L'expression des gènes du transporteur a subi une modulation considérable au sein des cellules cultivées en présence des probiotiques. Plusieurs gènes codant pour les éléments IE tels que le PTS *transporter subunit EIIC* ont été sous-exprimés entre -4,54 log₂ et -2,16 log₂ fois en présence des probiotiques (Annexe 1). Le gène qui code pour la protéine CDIF27147 de la *HPr family phosphocarrier protein* a également été sous-exprimé de -1,25 log₂ fois (Annexe 1).

Plus de 24 gènes codants pour les systèmes PTS ont été sous-exprimés entre -0,7 et -5,4 log₂ fois en présence des Lactobacilles (Annexe 1). On observe également 39 gènes codants pour les systèmes de transport ABC ont été sous-exprimés en présence des Lactobacilles (Annexe 1). Plusieurs gènes impliqués dans le transport du fructose et du mannose ont été sous-exprimés entre -1,12 et -3,4 log₂ fois (Annexe 1). Enfin, le gène CDIF27147 qui code pour la *GTP pyrophosphokinase family protein* a été sous-exprimé de -1,07 log₂ fois (Annexe 1).

2.1.8 Autres protéines

Les protéines de liaison à la pénicilline (PBP) sont un groupe de protéines caractérisées par leur affinité et leur liaison à la pénicilline. Ils sont un constituant normal de nombreuses bactéries. Tous les antibiotiques β-lactamines (à l'exception de la tabtoxinine-β-lactamine, qui inhibe la glutamine synthétase) se lient aux PBP, qui sont essentiels à la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne. Le gène qui code pour la protéine *penicillin-binding 2* a été sous-exprimé de -1,63 log₂ fois en présence des probiotiques (Annexe 1). Le gène qui code pour la protéine *antibiotic biosynthesis monooxygenase* a également été sous-exprimé de -2,7 log₂ fois en présence des Lactobacilles (Annexe 1).

Objectif 3. Confirmation par RT-qPCR la modulation de l'expression des gènes observée lors des essais de transcriptomique.

1. Optimisation des amorces

1.1 Gradients de température

La température d'hybridation d'une amorce dépend de sa température de fusion (T_m). La température de fusion d'un fragment d'ADN double brin correspond à la température pour laquelle 50 % de ce fragment est dissocié sous forme d'ADN simple brin. Pour l'ensemble des amorces, parmi les 8 températures testées, les T_m optimaux étaient de 60°C (Tableau 9).

1.2 Spécificité

La spécificité de l'ensemble des amorces de *C. difficile* R20291 a bien été confirmée par BLAST. Par PCR, aucune des amorces n'a amplifiée de gènes de *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2. Des amplifications ont bien eu lieu pour l'ADNc de *C. difficile* utilisé comme contrôle positif. L'ensemble des amorces, dont les gènes de référence, étaient bien spécifiques à *C. difficile* R20291.

1.3 Stabilité

Afin d'assurer l'exactitude de l'analyse RT-qPCR ultérieure, il a été déterminé qu'un certain nombre de gènes de référence seraient testés dans les conditions des co-cultures avec les souches probiotiques et les deux gènes de référence les plus efficaces seraient choisis pour toutes les analyses qPCR ultérieures. Metcalf *et al.*, (2010) ont déjà étudié l'utilisation de huit gènes de référence dans des expériences de qPCR au sein d'un certain nombre de ribotypes de *C. difficile*. Des courbes standards ont été réalisées et à partir des données obtenues, en plus de l'utilisation du logiciel Maestro, il a été déterminé que les deux gènes de référence les plus appropriés de l'étude de Metcalf *et al.*, (2010) à utiliser dans toutes les analyses ultérieures seraient *adk* et *rpoA* (Tableau 9).

1.4 Efficacité

Afin d'évaluer les performances d'un jeu d'amorces et ainsi garantir que la qualité des données RT-qPCR produites était d'un niveau acceptable, les courbes standard produites pour chaque gène ont été évaluées en utilisant les critères suivants : Efficacité : 90 à 110% ; Pente : -3,6 à -3,1 ; $R^2 > 0,99$ (Figure 16).

Dans la méthode de quantification de la courbe standard, la pente désigne l'efficacité géométrique et les données sont calibrées à partir de l'ordonnée à l'origine Y-intercept (Ruijter *et al.*, 2021). Le tableau 12 montre les données de courbe standard produites pour les gènes étudiés dans ce chapitre, il montre que toutes les valeurs se situent dans les paramètres spécifiés. Les figures 16, 17, 18 montrent des images représentatives des figures obtenues pour le gène *fliC* seul à partir d'une expérience typique de RT-qPCR.

Tableau 12 : Données des courbes standards pour tous les gènes de *Clostridioides difficile* R20291 étudiés par RT-qPCR dans ce chapitre.

	Efficacité (%)	R ²	Pente	Y-intercept
<i>adk</i>	100	0,998	-3,322	22,389
<i>rpoA</i>	98,4	0,998	-3,362	21,688
<i>fliC</i>	109,2	0,993	-3,119	29,386
<i>fliE</i>	105,7	0,993	-3,192	28,910
<i>fliG</i>	102,4	0,992	-3,267	29,890
<i>motB</i>	94,6	0,991	-3,527	23,762

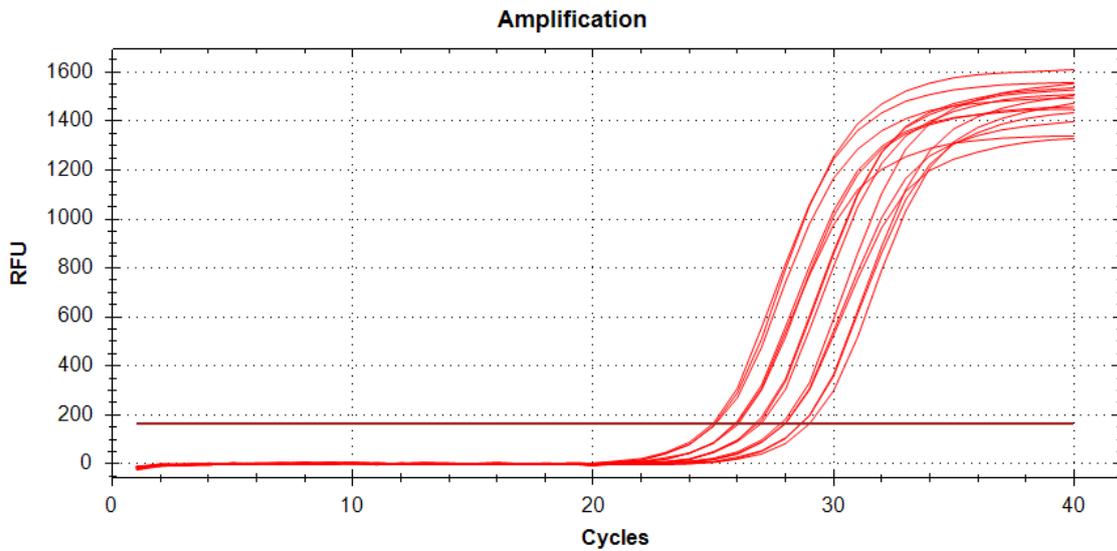


Figure 16 : Exemple de courbe d'amplification RT-qPCR pour le gène *fliC* en utilisant des dilutions de facteur de 10 de l'ADNc de *Clostridioides difficile* R20291.

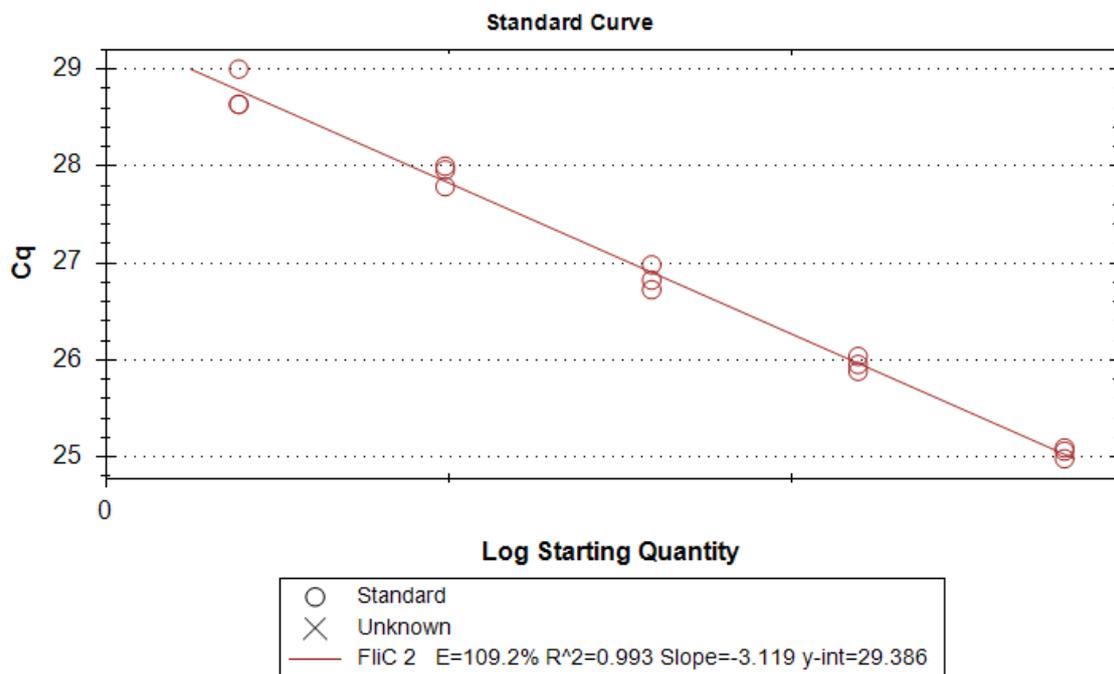


Figure 17 : Exemple de courbe standard RT-qPCR pour le gène *fliC* en utilisant des dilutions de facteur de 10 de l'ADNc de *Clostridioides difficile* R20291.

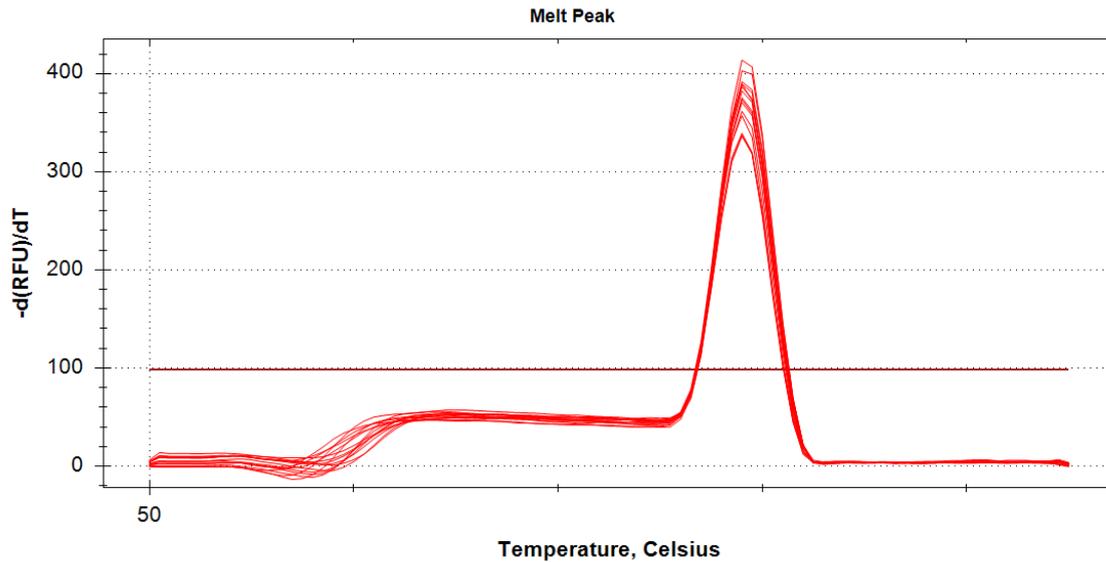


Figure 18 : Exemple de courbe de fusion RT-qPCR pour le gène *fliC* en utilisant des dilutions de facteur de 10 de l'ADNc de *Clostridioides difficile* R20291.

2. Validation des amorces par électrophorèse.

La validation des ensembles d'amorces montre que les amorces sont capables de se lier à l'ADN matrice de *C. difficile* R20291 et de produire un amplicon de la taille attendue lorsqu'elles sont visualisées par électrophorèse sur gel, avant leur utilisation en RT-qPCR.

Tableau 13 : Amorces provenant de la compagnie Integrated DNA technologies IDT ciblant les gènes de référence ou gènes de virulence de *Clostridioides difficile* R20291 utilisées dans les essais d'expression de gène.

Gène ciblé	Code		Efficacité (%)	Tm (°C)
<i>rpoA</i>	CD_rpoA_MB1.F	5'-GCT CTA TCA CAG GTG CAG ATA TAA-3'	98,4	60
	CD_rpoA_MB1.R	5'-TCA GCA GAA ACA TAA CCT CTA CC-3'		
<i>adk</i>	CD_adk_MB1.F	5'-CAG GTG CTG GTA AAG GTA CTC -3'	100,0	60
	CD_adk_MB1.R	5'-TTC CAA GTT CTG TTC CCT CTT T-3'		
<i>fliC</i>	CD_FliC_ZM1.F	5'-GGT TTA GAC CAA GCA GGA AGA-3'	109,2	60
	CD_FliC_ZM1.R	5'-CCA GAA GTT CCA TCT GCA TTT AAG-3'		
<i>motB</i>	CD_MotB_ZM1.F	5'-ACA GGT TCA AGT ACA AGT GAG AA-3'	94,6	60
	CD_MotB_ZM1.R	5'-AGA GTG GCT TTA CTA TCT GCT TT-3'		
<i>fliG</i>	CD_FliG_ZM1.F	5'-ATG GAG GAG TGT CTA CCT TAG T-3'	102,4	60
	CD_FliG_ZM1.R	5'-CAG CCT CAA CCT GTG TAA CT-3'		
<i>fliE</i>	CD_FliE_ZM1.F	5'-AAT GCA AGG TGC AAA GTT AGA T-3'	105,7	60
	CD_FliE_ZM1.R	5'-AGC TGT GCT TCT TGA CCT ATT A-3'		

3. Confirmation des résultats de l'étude transcriptomique par RT-qPCR.

Les gènes *fliC*, *motB*, *fliG*, *fliE* de la souche *C. difficile* R20291 liés à la motilité ont été sous-exprimés en contact des souches probiotiques. Des amorces ont été mises au point afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude transcriptomique. Une fois la mise au point des amorces terminée, des RT-qPCR ont été réalisés sur les mêmes échantillons de fermentation utilisés lors de l'étude transcriptomique soit les trois fermentations de *C. difficile* seul et les trois fermentations de *C. difficile* cultivé avec les trois souches probiotiques.

Les gènes *fliC*, *motB*, *fliG*, *fliE* de la souche *C. difficile* R20291 ont été sous-exprimés de façon significative en présence des souches probiotiques *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 (Figure 18) lors des essais de RT-qPCR (Figure 19). Il est donc possible de conclure que les résultats de RT-qPCR concordent avec l'analyse transcriptomique pour les gènes de motilité.

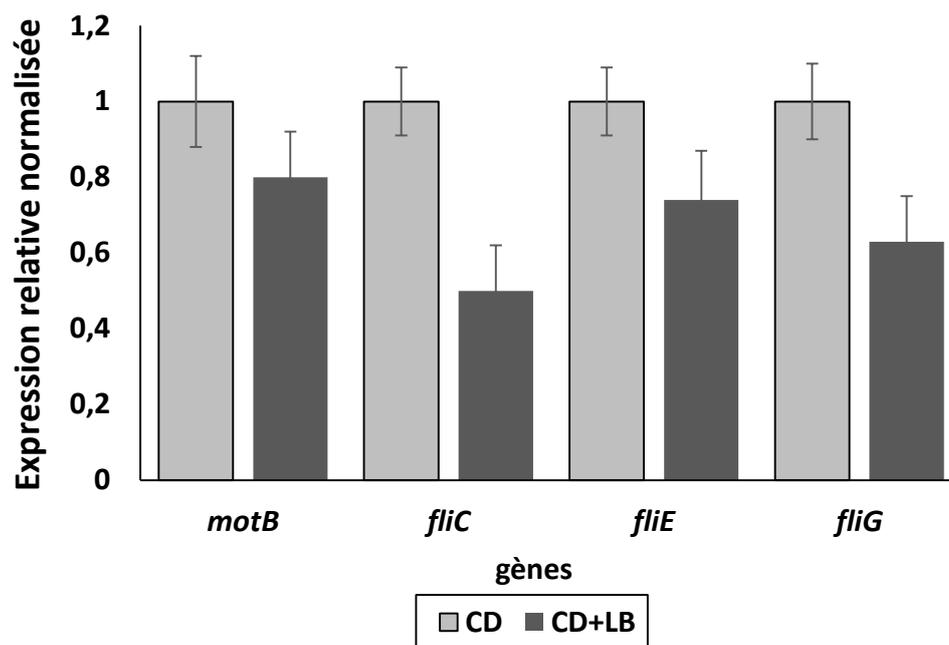


Figure 19 : Confirmation par RT-qPCR de l'expression des gènes liés à la motilité de *Clostridioides difficile* R20291 en co-culture avec *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 par rapport aux monocultures.

Les gènes *motB*, *fliE*, *FliC* et *FliG* ont été sous-exprimés de façon significative entre 0,5 et 0,8 fois moins en présence des lactobacilles lors des essais de RT-qPCR.

Discussion

IV. Discussion

Objectif 1. Confirmation de l'effet anti-toxines des souches probiotiques.

L'objectif de cette étude sur la fermentation en co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques était de confirmer l'effet anti-toxine sur *C. difficile* R20291 des souches probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2, indépendant de l'acidification du milieu, en fermenteur où le pH était contrôlé en temps réel. En 2012, une étude avait été menée afin d'étudier les propriétés antimicrobiennes de quinze souches sélectionnées appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus* contre des bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives telles que *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridioides difficile*. Ces expériences avaient confirmé la capacité de certaines souches probiotiques à inhiber la croissance des agents pathogènes sélectionnés. L'un des principaux mécanismes inhibiteurs résultait de la production d'acides organiques à partir de la fermentation du glucose et de l'abaissement consécutif du pH de la culture. Cette observation a été confirmée lorsque le profil des acides organiques a été analysé démontrant que l'acide lactique et l'acide acétique étaient les principaux produits finaux du métabolisme des probiotiques (Tejero-Sariñena *et al.*, 2012). Des travaux antérieurs ont également démontrés que les souches du probiotique Bio-K+ inhibent la croissance de *C. difficile* et réduisent la sécrétion des toxines A et B selon un mécanisme non-spécifique, c'est-à-dire via l'acidification du milieu de culture (Gunarathnam *et al.*, 2021). Cependant, l'inhibition de la sécrétion des toxines A et B a également été observée dans des essais de co-culture et ce, même lorsque le milieu de culture est tamponné.

Ainsi, les bactéries ont été cultivées dans un milieu BHI en fermenteur où le pH était contrôlé. Après 12 et 24h de culture, il n'y a pas eu de différence significative entre la croissance de *C. difficile* seul et celle en présence des souches probiotiques. Cette étude avait aussi pour but de vérifier les effets de *C. difficile* sur les souches probiotiques dans un milieu sous contrôle du pH. La croissance des lactobacilles n'a pas été affectée par la présence de *C. difficile* durant les 24 h de fermentation. On peut donc conclure que dans ce modèle, dans un système à pH contrôlé, la présence des lactobacilles n'affecte pas la croissance de *C. difficile* et inversement.

Afin de démontrer que l'inhibition de la sécrétion de toxines de *C. difficile* par les souches probiotiques a lieu lors des essais de fermentation, les toxines A et B ont été quantifiées après 12 et 24 h de culture en fermenteur. Dans cette expérience, il a été possible de démontrer que les concentrations de toxines A et B étaient inférieures à la limite de quantification du kit ELISA (≤ 1.25 ng/mL) pour les co-cultures avec les souches probiotiques, mais également pour la toxine B en mono-culture après 12 h. L'incapacité à détecter TcdB dans les échantillons après 12 h de culture en fermenteur par ELISA est probablement due à l'abondance relativement faible de cette protéine par rapport à celle de TcdA, comme cela a déjà été rapporté (Warny *et al.*, 2005). Après 24 h, il a été possible d'observer une réduction statistiquement significative de la production de toxine A de 47% ($p \leq 0.05$) en présence des souches *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2. En revanche, la présence des souches probiotiques n'a pas affecté significativement la production de toxine B ($p > 0.05$), probablement parce que la concentration de celle-ci était très peu sécrétée dans le milieu. Le pH du milieu étant contrôlé à 7.0 dans le fermenteur, l'acidification lactique ne peut pas être le seul mécanisme d'action par lequel les trois souches probiotiques exercent une action préventive contre les ICD. Cette observation suggère qu'il y a un/des mécanisme(s) d'action autres que l'acidification et potentiellement spécifiques aux lactobacilles qui ralentit la sécrétion au moins de la toxine A. Les pourcentages de réduction observés démontrent que la co-culture avec les trois souches de lactobacilles a un effet sur la quantité de toxine A détectée sans que ce soit provoqué par une acidification. À la suite de ces résultats, plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'expliquer la réduction de la toxine A de *C. difficile* dans le modèle.

Il a été établi que pour *Saccharomyces boulardii*, la sécrétion d'une protéase de 54 kDa à sérine est capable de dégrader et d'inactiver les toxines A et B de *C. difficile* (Castagliuolo *et al.*, 1999). De plus, la protéase de *S. boulardii* diminue la capacité des toxines A et B à se lier à la membrane des cellules de la bordure en brosse colique humaine empêchant ainsi les toxines de *C. difficile* d'exercer leurs effets directs sur les cellules du colon. La membrane de la bordure en brosse est une membrane métabolique fonctionnelle, constituée de nombreuses enzymes impliquées dans la digestion et l'absorption des nutriments (Woodley, 1994).

Il a été démontré qu'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéase de 54 kDa de *S. boulardii* a aboli son activité protéolytique contre les toxines A et B, en plus de l'inhibition de la liaison des toxines A et B radiomarquées à la membrane de colonocytes humains.

Plus important encore, l'anticorps anti-protéase de *S. boulardii* a complètement supprimé l'effet inhibiteur du milieu conditionné de *S. boulardii* sur la sécrétion de fluide ainsi que sur la perméabilité des muqueuses après l'administration de la toxine A dans l'iléon (troisième partie de l'intestin grêle) de rat *in vivo*.

Les souches de lactobacilles pourraient également produire une molécule telle qu'une protéase capable de cliver les toxines de *C. difficile* ou encore posséder une activité enzymatique dirigée contre les toxines. Gunaratnam *et al.* (2019) ont testé un surnageant de culture de *C. difficile* contenant des toxines A et B. Le surnageant de toxines A et B avait été filtré puis incubé avec les trois souches probiotiques durant 24 h. Les toxines A et B avaient ensuite été quantifiées par la méthode ELISA avec et sans les souches probiotiques. Les résultats ont démontré qu'il n'y avait aucune différence significative ($P > 0.05$) entre la quantité de toxines au début de l'incubation versus la fin de l'incubation avec les souches probiotiques, ce qui pourrait signifier que les toxines ne sont pas dégradées ou adsorbées par les lactobacilles (Gunaratnam, 2019). Cependant le test ELISA reste une expérience quantitative et non qualitative. Selon l'épitope utilisé pour les anticorps, il aurait pu y avoir une détection même si la protéine est clivée. Un western blot aurait été plus approprié afin de vérifier l'intégrité de la protéine. D'autres expériences peuvent être menées afin de voir si une protéase est impliquée dans l'effet anti-toxine, un isolement et une concentration des protéines pourraient être réalisés afin de tester si l'effet est conservé. Il serait également intéressant de traiter le surnageant des lactobacilles avec des protéases qui pourraient dégrader la potentielle protéase du milieu afin d'observer si l'effet anti-toxine est conservé.

Dans l'étude menée par Castagliuolo *et al.* (1999), la résistance électrique trans-épithéliale/endothéliale (TEER) a également été mesurée. Le dispositif utilisé appelé chambre d'Ussing permet de mesurer le transport des ions à travers le tissu épithélial, il permet de mesurer *ex-vivo* les caractéristiques électriques d'un épithélium et ainsi de mesurer l'activité de transporteurs électrogéniques ou les paramètres reflétant la perméabilité intestinale (Castagliuolo *et al.*, 1999). La TEER induite par les toxines A et B dans la muqueuse colique humaine a été réduite de 60 et 68 %, respectivement en préexposant les toxines à la protéase de *S. boulardii* (Castagliuolo *et al.*, 1999).

Il serait intéressant de réaliser une expérience en mesurant l'activité protéolytique dans trois milieux conditionnés distincts avec les souches probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 selon la méthode décrite par Roth *et al.*, (1971).

Cette méthode se base sur la libération de fragments radioactifs solubles d'un substrat de méthémoglobine [méthyl¹⁴C] (Roth *et al.*, 1971). Dans un second temps, l'effet des potentielles protéases sur la dégradation de la toxine A de *C. difficile* pourrait être étudié par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) comme indiqué dans le protocole de Castagliuolo *et al.*, (1999). Enfin, la TEER induite par les toxines de *C. difficile* sur la muqueuse colique humaine pourra être mesurée en présence et absence des protéases potentiellement produites par les trois souches probiotiques testées.

Lam *et al.*, (2016) avait démontré que certains probiotiques testés (*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* LGG et *Lactobacillus reuteri*) peuvent inhiber la liaison et l'internalisation des neurotoxines de *C. botulinum* par un mécanisme autre que la dégradation ou la séquestration des neurotoxines (Lam *et al.*, 2016). Les neurotoxines botuliques (BoNTs) sont parmi les toxines naturelles les plus toxiques connues de l'homme et constituent une menace pour la santé et la sécurité publiques. Le complexe BoNT de sérotype A de et l'holotoxine de *C. botulinum* peuvent se lier et transiter par l'épithélium intestinal pour se disséminer dans le sang. L'étude menée par Lam *et al.* (2016) a permis de démontrer que certains probiotiques peuvent bloquer l'absorption de BoNT/A dans le système de culture cellulaire *in vitro* utilisant des cellules Caco-2. Ces résultats montrent pour la première fois qu'un traitement à base de probiotiques peut inhiber la liaison et l'internalisation de BoNT/A *in vitro* (Lam *et al.*, 2016).

Dans le cas de *C. difficile*, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet des souches probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 sur l'absorption des toxines A et B de *C. difficile* dans un système de culture cellulaire *in vitro* utilisant des cellules Caco-2. Les cellules Caco-2 seront cultivées sur de lamelles de verre et prétraitées avec les souches probiotiques Bio-K+. Après incubation, les lamelles seront rincées et à nouveau incubées avec des anticorps des toxines A et B de *C. difficile* comme indiqué dans le protocole de Lam *et al.* (2016). Les lamelles pourront ensuite être colorées avec de la rhodamine-phalloïdine afin de délimiter le cytosquelette d'actine dans les cellules. La potentielle diminution de l'absorption de toxines A et B dans le système de culture cellulaire *in vitro* pourra ensuite être observée au microscope confocal.

Bien que cette expérience ne renseigne pas directement sur la réduction de la toxine A dans le modèle présenté dans ce mémoire, elle se montre tout de même pertinente dans l'élucidation des mécanismes anti-*C. difficile* des souches probiotiques Bio-K+.

Selon Setia *et al.* (2009), certaines toxines de la bactérie *E. coli* sont séquestrées en présence de souches probiotiques. Les infections à *E. coli* entérohémorragique (EHEC) provoquent des épidémies sporadiques de colite hémorragique dans le monde (~ 100 000 cas par an aux États-Unis) (Riley *et al.*, 1983) et sont caractérisées par l'expression des gènes de la toxine Shiga (Stx). Les toxines Shiga sont des protéines capables d'inactiver les ribosomes en éliminant un résidu d'adénine spécifique de l'ARNr 28S de la grande sous-unité ribosomique, ayant pour effet l'inhibition de la synthèse des protéines.

La toxine Shiga est essentielle pour le développement du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Des travaux récents ont indiqué que les souches EHEC mutées pour la production de toxine Shiga perdaient leur virulence dans un modèle de souris sans germe. Afin de réduire l'incidence des cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU), Paton *et al.* (2006) ont généré des probiotiques modifiés génétiquement dans lesquels le récepteur oligosaccharidique Gb3 de la Shigatoxine (Stx) est exprimé à la surface cellulaire d'une souche d'*E. coli* (Paton *et al.*, 2001; Paton *et al.*, 2006; Pinyon *et al.*, 2004). Ils ont observé que cette souche probiotique a été capable de neutraliser la Stx *in vitro* et des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des bactéries exprimant des récepteurs pour des toxines produites par d'autres agents pathogènes diarrhéiques, notamment *E. coli* entérotoxigène (cause la plus fréquente de diarrhée du voyageur) et *Vibrio cholerae* (Britton & Versalovic, 2008).

Afin de déterminer si les toxines de la souche de *C. difficile* R20291 pouvaient être séquestrées par les souches probiotiques *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. rhamnosus* CLR2, des expériences sur des monocultures et des co-cultures de *C. difficile* avec les souches probiotiques ont été menées au laboratoire dans le passé (Gunaratnam *et al.* 2019). Après une lyse chimique, enzymatique, thermique et mécanique (voir matériel et méthode (Jonquière *et al.*, 1999) des échantillons ont été recueillis afin d'effectuer des dénombrements bactériens ainsi que la quantification des toxines. Les résultats d'une première série d'expériences ont suggérés que la quantité de toxines A et B mesurée à l'intérieur des souches probiotiques dans la co-culture était nulle. Ces résultats suggèrent que les lactobacilles ne séquestrent pas les toxines de *C. difficile*.

Différentes études ont déjà démontrées que des souches probiotiques pouvaient également moduler l'expression des gènes du PaloC en les sous exprimants (Abt *et al.*, 2016). Une analyse transcriptomique a été réalisée sur des cellules de *C. difficile* ATCC 9689 qui ont été exposées séparément à différentes doses de *Bifidobacterium breve* YH68 (Yang & Yang, 2020). Les niveaux d'expression de *tcdA* et *tcdB* avaient diminué progressivement avec l'augmentation des doses de *B. breve* YH68 après 24 h. Cependant, les niveaux d'expression de *tcdA* avaient augmenté après 48 h par rapport à ceux à 24 h. Pour *tcdB*, un faible effet significatif avait été observé avec des doses croissantes de YH68, suggérant une relation dose-réponse même après 48 h.

Bacillus coagulans Gbi-30 inhibe la croissance de *Clostridium perfringens* et réduit significativement l'expression du gène qui code pour la toxine alpha de *C. perfringens*. *B. coagulans* peut également réduire la cytotoxicité et le taux d'apoptose induits sur les cellules HT-29 (Kawarizadeh *et al.*, 2019). Cependant, l'étude transcriptomique menée sur *C. difficile* en co-culture avec les souches probiotiques Bio-K+ pour ce mémoire a démontré que les souches probiotiques testées ne modulent pas l'expression des gènes du PaloC. La réduction de la toxine A de *C. difficile* en présence des souches probiotiques n'est donc pas liée à la modulation des gènes de toxines.

Objectif 2. Évaluation de l'impact de la co-culture de *C. difficile* avec les souches probiotiques sur l'expression de l'ensemble des gènes de *C. difficile* par transcriptomique.

Dans un premier temps, l'optimisation de l'extraction d'ARN a permis d'obtenir des échantillons concentrés en ARN (supérieur à 100 ng/μL) avec des RIN supérieurs à 7 et de bons ratios 260/230 et 260/280. La qualité de l'ARN est un élément essentiel lors des études transcriptomiques.

La grande majorité des DEGs étaient principalement impliquées dans les voies métaboliques de transport des glucides, des acides aminés et de l'énergie. *C. difficile* semble modifier ses voies métaboliques en fonction des différentes sources de carbone et d'azote et génère ensuite de l'énergie par l'utilisation de ces substances nutritives pour soutenir sa croissance normale (Annexe 1) (Hofmann *et al.*, 2018). Le métabolisme des acides aminés joue un rôle essentiel dans la croissance de *C. difficile* (Fletcher *et al.*, 2018), il a été affecté en co-culture, notamment pour la proline, l'un des nutriments essentiel pour *C. difficile*. L'isoleucine, dont les voies métaboliques ont également été régulées à la baisse, a pour rôle de réduire la proline réductase pendant la réaction de Stickland afin de promouvoir le système global d'approvisionnement en énergie chez *C. difficile* (Hofmann *et al.*, 2018). Les grands changements des voies métaboliques des glucides et des acides aminés sont potentiellement dus aux changements de l'environnement de culture lié à la présence des lactobacilles, modifiant les substances nutritives essentielles à *C. difficile* tel que le glucose et la peptone dans les bouillons BHI.

Une étude transcriptomique réalisée sur des essais de co-cultures de *C. difficile* en présence de différentes doses de *Bifidobacterium breve* avait mis en évidence que les activités métaboliques des glucides et des acides aminés dans les cultures moins concentrées en probiotiques étaient plus actives que celles avec des fortes concentrations de probiotiques bien que le volume et la concentration des bouillons BHI soient les mêmes (Yang & Yang, 2020). Ce phénomène était très probablement dû au fait que certaines substances sécrétées atteignaient un niveau élevé dans les cultures hautement concentrées en probiotiques. Ces substances inhibaient les activités métaboliques des cellules *C. difficile*, alors que ces mêmes substances étaient faiblement concentrées dans les cultures pauvres en probiotiques (Yang & Yang, 2020).

Les changements des activités métaboliques de *C. difficile* lors des essais de fermentation sont potentiellement dus aux changements de composition de l'environnement de culture liés à la présence des lactobacilles. Les substances sécrétées par les probiotiques pourraient inhiber les activités métaboliques des cellules de *C. difficile*, comme décrit dans l'étude de Yang & Yang (2020).

Les gènes HPr kinase/phosphorylase étaient également régulés à la baisse dans l'étude, ce sont des gènes connus pour phosphoryler la protéine phosphocarrier cytoplasmique Hpr à Ser42 ce qui conduit à l'initiation du répresseur de catabolites de carbone de la famille LacI, CcpA (Martin-Verstraete *et al.*, 2016). La protéine CcpA est un régulateur central chez les bactéries à Gram positif qui agit comme un activateur transcriptionnel de gènes impliqués dans divers phénomènes, tels que la glycolyse et la fixation de l'ammonium (Mahr *et al.*, 2000). L'inactivation des gènes HPr dû à la présence des probiotiques a pu avoir un impact sur l'initiation du répresseur de catabolites de carbone et donc dans la glycolyse de *C. difficile*.

Le système de phosphotransférase (PTS) est un mécanisme de signalisation connecté à la chimiotaxie et aux capacités de régulation liées au métabolisme du C, N et P ainsi qu'à la virulence de *C. difficile* (Antunes *et al.*, 2011; Deutscher *et al.*, 2014). Une grande majorité des gènes associés aux PTS étaient régulés à la baisse dans l'étude. Les PTS représentent un mécanisme important d'absorption de sucre chez les bactéries. Dans le passé, il a été démontré que la répression des catabolites de carbone affectait la production de toxines chez *C. difficile* (Deutscher *et al.*, 2014). Dans le cas de l'opéron spécifique au PTS du mannitol sous exprimé dans l'étude, il a été démontré (grâce à l'utilisation de tests de cytotoxicité qui ont montré une toxicité bactérienne réduite en présence de mannitol) que la suppression de la synthèse de toxine en présence de mannitol dépend de l'absorption du substrat via cet opéron (Niall Bollard, 2018). D'autres études ont démontré une relation complexe entre un certain nombre de processus cellulaires tels que la répression des catabolites du carbone, le transport du sucre et le métabolisme des acides aminés sur la régulation de la production de toxines chez *C. difficile* (Suárez *et al.*, 2013).

De plus, l'ensemble des données de l'étude montre une baisse de l'expression du gène codant pour l'élément EI (CD2755) qui est un composant essentiel de tous les PTS dans la cellule (Bramley & Kornberg, 1987).

Comme évoqué précédemment, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans le transport de l'énergie et de la membrane ont été sous-exprimés. Ces résultats suggèrent que les souches probiotiques ont interféré non seulement avec la manière dont *C. difficile* obtient de l'énergie, mais également avec le processus de transport des nutriments. De nombreux gènes codant pour les transporteurs ABC ont également été sous-exprimés en présence des souches probiotiques, notamment de nombreux gènes impliqués dans le transport des vitamines, des acides aminés, des phosphates de sucre et des oligopeptides (Suárez *et al.*, 2013).

Ainsi, les changements du transcriptome de *C. difficile* ont révélé que les principales voies métaboliques impliquées dans le métabolisme des sources de carbone et d'azote dans les cellules avaient été affectées. Les probiotiques testés ont également largement impacté les systèmes de transports ainsi que les PTS de *C. difficile*, systèmes importants pour le bon fonctionnement de la cellule notamment dans l'expression de sa virulence. Par la suite, l'étude s'est penchée sur les gènes directement liés à la virulence de *C. difficile*.

Lors de l'étude transcriptomique, l'une des premières observations s'est portée sur les gènes de toxines présents sur le locus de pathogénicité PaloC comme *tcdA* et *tcdB*. Aucun des gènes présents sur le PaloC n'a eu son expression modulée en présence des souches probiotiques. Cependant une diminution de 48% de la toxine A avait été observée après 12 h d'incubation en présence des souches probiotiques. Il semblerait donc qu'un autre mécanisme serait impliqué dans la réduction de la sécrétion de la toxine A de *C. difficile*. Comme dans les hypothèses détaillées en discussion du chapitre 1, il serait possible que la toxine A soit séquestrée ou que les souches probiotiques pourraient dégrader les protéines de toxine A. Ce phénomène a d'ailleurs été démontré chez *S. boulardii* qui sécrète une protéase à sérine capable de dégrader et d'inactiver les toxines A et B de *C. difficile* (Castagliuolo *et al.*, 1999). Dans un second temps, l'étude s'est intéressée sur les gènes liés aux mutations et à la résistance aux antibiotiques.

Les micro-organismes ont la capacité de générer plusieurs types de mutations incluant des mutations ponctuelles aléatoires, l'évolution induite par ces mutations est très lente et n'est pas contrôlée par la bactérie. Il existe également des transferts horizontaux qui sont beaucoup plus rapides, ce sont ces mécanismes qui sont à l'origine d'une grande partie de la diversité génétique des micro-organismes. Il existe trois mécanismes : La transduction, la transformation et la conjugaison (Meyer, 2009). La conjugaison est un phénomène qui aboutit au transfert d'informations génétiques d'une bactérie à une autre. Elle consiste en une transmission d'ADN plasmidique ou d'ADN chromosomique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse et potentiellement en son intégration dans le génome de celle-ci (Cundy & Shin, 2017). Chez les procaryotes, la multiplication est asexuée : elle est réalisée par de simples divisions cellulaires. Lors de ces divisions, le génome bactérien est répliqué, puis est réparti équitablement entre la cellule mère et la cellule fille. Le brassage génétique est essentiel à la survie d'une espèce puisqu'il permet indirectement aux individus de s'adapter à leur environnement. C'est pourquoi plusieurs autres techniques se sont développées permettant d'assurer une diversité génétique suffisante chez les bactéries. Le phénomène serait environ 1000 fois plus important au sein d'un biofilm qu'entre individus planctoniques (Lebeaux *et al.*, 2014).

Dans l'étude transcriptomique, la protéine MobA a été sous-exprimée de 6,6 log₂ fold. Cette protéine fait partie des trois protéines essentielles dans les mécanismes de conjugaison de *C. difficile*. MobA est la plus grande de ces protéines et est composée d'une chaîne polypeptidique de 709 acides aminés. Les souches probiotiques testées semblent être capable d'inhiber la synthèse de l'une des trois protéines nécessaires pour le transfert de gènes ou le mouvement d'éléments mobiles en réduisant l'expression de MobA. Chez *C. difficile*, les transferts de matériel génétique sont importants. Par exemple, les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent très rapidement se propager dans la population mondiale de bactéries. Progressivement, les bactéries peuvent acquérir une résistance à de multiples antibiotiques ce qui entraîne des conséquences terribles sur la santé humaine. Les échanges sont si efficaces que la population mondiale bactérienne peut être modélisée par un organisme unique s'échangeant des informations à la manière de cellules dans un corps humain (Jennison & Verma, 2004).

Les résistances aux antibiotiques ne sont pas les seules concernées. En effet, d'autres résistances peuvent elles aussi être transférées : métaux lourds, radiations, bactériophages. Ce sont ces mécanismes qui, au fil du temps, ont transformé la bactérie bien connue *Escherichia coli* en *Shigella flexneri*, responsable de la dysenterie (Jennison & Verma, 2004). Les probiotiques testés semblent donc affecter la conjugaison bactérienne de *C. difficile* lors des essais de co-culture.

Des expérimentations de transferts de plasmides pourraient être menées sur *C. difficile* en présence des souches probiotiques afin d'observer si celles-ci peuvent limiter le transfert de gènes importants dans le mécanisme d'acquisition de résistance aux antibiotiques.

Les tests sur la communication bactérienne ont montré des niveaux d'expression des gènes associés à LuxS et au à la peptide signal régulés à la baisse suggérant que les souches probiotiques peuvent bloquer et réduire au silence l'expression de gènes clés dans le système de *quorum sensing* (QS) (Mion *et al.*, 2019). LuxS possède également un rôle dans les interactions inter-espèces au sein des biofilms. En effet, la protéine LuxS utilise différents mécanismes afin de médier la formation de biofilms grâce à la communication bactérienne (Slater *et al.*, 2019). La communication bactérienne est un outil d'intérêt global pour la communauté bactérienne ; les bactéries présentes dans les biofilms sont protégées contre de multiples stress, notamment les réponses immunitaires et les agents antimicrobiens (Slater *et al.*, 2019).

Plusieurs auteurs ont démontré que certaines souches de lactobacilles peuvent interférer dans le système de QS. Valdez *et al.* (2005) ont étudié 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 *L. reuteri* RC-14 produit des petites molécules de signalisation capables d'interférer avec le système de QS de *Staphylococcus aureus*, ce qui réprime l'expression du gène codant pour la toxine du syndrome du choc toxique TSST-1. De plus, il a été mis en évidence que la souche *L. acidophilus* GP1B a un effet inhibiteur non seulement sur la croissance de *C. difficile* mais aussi 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 démontrent que la combinaison *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2 interfèrent également avec la communication de *C. difficile* en modulant l'expression du gène *luxS* (Yang *et al.*, 2020).

Comme évoqué précédemment, certaines bactéries dont *C. difficile* sont dotées d'un caractère physiologique particulier tel que le flagelle qui leur permet de se déplacer de manière autonome. Lors de l'étude transcriptomique, l'ensemble des gènes de motilité ont été sous-exprimés par la présence des souches probiotiques. Pour la plupart des agents pathogènes gastro-intestinaux, les flagelles et leur motilité sont reconnus comme des facteurs de virulence essentiels ; ils permettent à l'agent pathogène de se déplacer vers le site de colonisation. Par exemple, les agents pathogènes entériques intestinaux *Listeria monocytogenes* (O'Neil & Marquis, 2006) et *Vibrio anguillarum* (Ormonde *et al.*, 2000) nécessitent obligatoirement une motilité fonctionnelle médiée par le flagelle pour envahir leurs hôtes et établir une colonisation réussie. La motilité médiée par le flagelle est également un facteur de virulence essentiel requis pour *Helicobacter pylori* afin de coloniser l'estomac (Eaton *et al.*, 1996).

Dans une étude menée par Tanja Dapa (2013), l'impact du gène flagellin *fliC* dans la formation de biofilm de *C. difficile* a été étudié. La formation de biofilm a été observée en mesurant la masse de biofilm au crystal violet aux jours 1, 3 et 5 entre la souche sauvage et la souche mutée *fliC* (Dapa *et al.*, 2013). Une diminution accrue de la masse du biofilm après 5 jours a été observée chez la souche mutée.

Ces résultats suggèrent que la motilité due aux flagelles est un élément important dans le développement des biofilms de *C. difficile* (Dapa *et al.*, 2013). Les bactéries présentes dans les biofilms sont protégées contre de multiples stress, notamment les réponses immunitaires et les agents antimicrobiens (Slater *et al.*, 2019). La capacité de formation de biofilm des agents pathogènes bactériens a été associée à une résistance accrue aux antibiotiques et aux infections chroniques récurrentes. Bien que les biofilms aient été bien étudiés pour plusieurs agents pathogènes intestinaux, on en sait peu sur la formation de biofilms par les espèces intestinales anaérobies. Les souches probiotiques testées semblent donc impacter la formation de biofilm de *C. difficile* via la sous expression de gènes liés à la communication et à la motilité bactérienne.

Dans une autre étude, Soza Baban *et al.*, (2013) ont comparés la motilité sur des mutants du gène *fliC* préalablement conçus à la motilité des souches sauvages sur gélose. Chez la souche possédant le mutant *fliC*, une inhibition totale de la motilité a été observée (Baban *et al.*, 2013). Une autre étude menée par Dingle *et al.* (Dingle *et al.*, 2011) sur l'adhérence des souches de *C. difficile* R20291 présentant un mutant *fliC* a été réalisée sur des cellules Caco-2. Les auteurs ont montré que les souches mutées avaient une adhérence significativement moins élevée que les souches sauvages.

Les mêmes résultats ont été observés avec le mutant du gène *motB*, protéine de rotation du moteur flagellaire qui a également été sous exprimé lors de l'analyse transcriptomique (Dingle *et al.*, 2011). Ces résultats *in vitro* indiquent que les flagelles ont un rôle dans la capacité d'adhésion cellulaire de la souche *C. difficile* R20291.

Une seconde étude *in vivo* a été menée sur la colonisation intestinale de *C. difficile* chez la souris. L'implantation intestinale (concentration d'UFC de *C. difficile* récupérée dans les fèces au cours de l'infection) et la colonisation caecale (concentration de *C. difficile* associée à la paroi caecale) de souris ont été mesurées. La comparaison entre la souche sauvage et le mutant *fliC* avait permis d'observer une meilleure implantation intestinale ainsi qu'une meilleure colonisation caecale chez la souche sauvage. Ces expériences *in vivo* confirment le rôle des flagelles en tant qu'adhésine au cours de la colonisation de *C. difficile* R20291 (Baban *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces études montrent que la sous-expression des gènes flagellaires de *C. difficile* dont le gène *fliC* via les souches probiotiques testées peut avoir un impact sur la motilité, l'adhérence et également la formation de biofilm.

Par la suite, l'étude s'est intéressée aux protéines chaperons qui peuvent être indirectement liées à la virulence de *C. difficile* et qui sont importantes dans le bon fonctionnement de la bactérie. La protéine GroEL a été sous-exprimée de façon significative. GroEL est un chaperon moléculaire qui fonctionne afin d'assurer le repliement approprié des polypeptides dans leur conformation protéique finale appropriée au sein de la cellule. GroEL fait partie d'un système de chaperonine GroEL/ES qui a été appelé « cage de repliement des protéines » (Georgescauld *et al.*, 2014). Il est largement admis que GroEL est une composante essentielle de la réponse naturelle au stress chez les procaryotes et a tendance à être induite lors de conditions de stress, notamment la sporulation, les températures élevées et la formation de biofilm (Arora *et al.*, 2017; Hennequin *et al.*, 2001a). Les gènes qui codent pour les protéines chaperons DnaJ, DnaK, HtpG et GrpE ont également été sous-exprimés lors de l'analyse transcriptomique. Par exemple, DnaK joue un rôle clé dans la division cellulaire, la ségrégation des chromosomes et le maintien des plasmides à faible nombre de copies. Bukau & Walker (1989) ont rapporté que la suppression de DnaK affectait à la fois la division et la croissance cellulaire de *C. difficile* (Bukau & Walker, 1990; Sugimoto *et al.*, 2008). En présence des souches probiotiques, la sous-expression des gènes liés aux protéines chaperons évoquées peut donc altérer la réponse au stress ainsi que la croissance de *C. difficile*.

Contrairement aux protéines chaperons, la sporulation est directement liée à la virulence de *C. difficile* et a largement été étudiée. Ces études ont permis de caractériser davantage les gènes sous le contrôle du régulateur principal Spo0A, facilitant ainsi l'identification des connexions possibles entre la sporulation et d'autres phénotypes (Lawley *et al.*, 2009; Pettit *et al.*, 2014; Saujet *et al.*, 2014). Lors de l'analyse, plusieurs gènes tels que le facteur sigma *spo0A*, *spoIVA* et *sigH* ont été surexprimés en présence des souches probiotiques. Ces gènes sont liés à l'initiation de la sporulation. Les résultats laissent supposer qu'en présence des lactobacilles, *C. difficile* subit différents stress tel que la limitation nutritionnelle et sporule afin d'assurer sa survie dans le milieu.

Cependant, d'autres gènes liés à la sporulation ont été significativement sous-exprimés en co-cultures. Par exemple, le gène *yqfD* a été sous-exprimé en présence des souches probiotiques, il est responsable de la résistance à la chaleur de la spore et empêche le développement de la réfractivité induisant des défauts dans la formation du cortex (Saujet *et al.*, 2013). Il en est de même pour le gène *spoIIIE* qui contribue au passage à la division polaire au cours de la sporulation et qui est responsable de l'activation du facteur de transcription spécifique à la cellule, σ^F . Le gène *spoVT* a également été sous-exprimé lors de l'analyse, au cours de la formation des spores, SpoVT a un impact majeur sur la germination et la résistance des spores résultantes, il régule également les gènes G-dépendants spécifiques aux présportes (Yao & Strauch, 2005).

Enfin, le gène *cotJA* qui fait partie de l'opéron *cotJ* a également été sous-exprimé. Le gène *cotJA* code pour les protéines d'enveloppe des spores, il est essentiel pour la formation de la couche externe qui offre une résistance chimique et également de la couche interne qui joue un rôle dans l'activation de la germination (Seyler Jr *et al.*, 1997).

À la lueur de cette analyse transcriptomique, il semble qu'en présence des souches probiotiques, *C. difficile* induirait plus facilement sa sporulation en réponse au stress. Cependant, les spores résultantes semblent être moins viables, moins résistantes, avec des défauts de formation du cortex et moins sujettes à l'activation de la germination. Par la suite, il serait intéressant et important de valider ces informations en allant mesurer des traits phénotypiques dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*.

Objectif 3. Confirmation par RT-qPCR la modulation de l'expression des gènes observée lors des essais de transcriptomique.

1. RT-qPCR et optimisation des gènes de référence

Il est largement admis que la RT-qPCR est l'une des méthodes les plus fiables et les plus efficaces pour quantifier le niveau d'expression d'acide nucléique dans un échantillon (Bustin, 2000). La haute qualité de l'ARN, comme discuté précédemment et l'utilisation de gènes de référence stables sont des paramètres essentiels en raison de l'importance d'une normalisation précise des niveaux d'expression génique relatifs permettant une interprétation cohérente des données de RT-qPCR. Certaines études d'expression de gènes publiées dans le passé ne sont pas considérées comme scientifiquement acceptables en raison de la faible qualité de l'ARN et de l'absence de courbe standard pour les gènes de référence. La qualité de l'ARN ainsi que les amorces de cette étude ont été soigneusement optimisés et contrôlés.

2. Flagelles, motilité et chimiotaxie

Les flagelles sont des appareils moléculaires capables de s'auto-assembler. Leur synthèse est un processus hautement ordonné. En effet, l'expression des gènes flagellaires permet que la production des pièces des stades ultérieurs soit inhibée jusqu'à ce que l'assemblage de pièces antérieures soit terminé. En association avec les pilis de type IV, les flagelles sont fortement impliqués dans la pathogenèse de plusieurs entéropathogènes. Nos données ont montré que plusieurs des gènes situés dans le locus flagellaire F3 tels que *fliE*, *fliI*, *fliJ*, *fliH*, *flgB*, *fliK*, *fliG*, *fliF*, *fliP*, *flgC* *flbD*, *motA*, *motB* comprenant ceux codant pour les constituants du corps basal, du moteur, du crochet et de la tige, étaient régulés à la baisse entre 1 et 5 fois en présence des souches probiotiques.

De plus, des gènes du locus F1 tel que *fliC* ont également été régulés à la baisse. Cela pourrait être dû à une exigence réduite pour ces protéines jusqu'à la construction du corps basal. La réduction de la motilité de *C. difficile* peut également être un outil utilisé par la bactérie pour augmenter son pouvoir pathogène. Il est connu que les flagelles sont impliqués dans le développement de lésions intestinales à travers les réponses inflammatoires de l'hôte. Le récepteur Toll-like 5 (TLR5) qui est connu pour reconnaître la flagelline bactérienne (FliC) conduit à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et MAPK et à la production de cytokines pro-inflammatoires (Batah & Kansau, 2016; Miao *et al.*, 2007; Rock *et al.*, 1998). Il a été démontré que TLR5 était impliqué dans l'apparition de nombreuses maladies, notamment les maladies inflammatoires de l'intestin (Stanislawowski *et al.*, 2009).

Comme évoqué précédemment, la réduction de l'expression des gènes flagellaires impacte la motilité de *C. difficile*. Cependant il est difficile d'affirmer que la motilité est inhibée, en effet il est possible de suggérer que dans l'environnement intestinal et en présence de matériau semi-solide, la cellule peut être propulsée par une structure moins exigeante en ressources comme les pilis de type IV dont l'expression n'a pas été régulée à la baisse en présence des souches probiotiques (Moore, 2021). Cependant tel que mentionné précédemment dans la section résultat de l'objectif 2, la motilité due aux flagelles est également un élément important dans le développement des biofilms de *C. difficile* (Đapa *et al.*, 2013). Différentes expériences *in vivo* ont également permis de confirmer le rôle des flagelles en tant qu'adhésine au cours de la colonisation de *C. difficile* R20291 (Baban *et al.*, 2013). L'ensemble des études évoquées dans la partie discussion du chapitre 2 montrent que la sous-expression des gènes flagellaires de *C. difficile* via les souches probiotiques testées peut potentiellement avoir un impact sur la motilité, l'adhérence et la formation de biofilm et donc nuire à la pathogénicité de *C. difficile*. L'étude transcriptomique a permis de mettre en lumière plusieurs nouveaux mécanismes anti-*C. difficile* potentiels des souches probiotiques testées. Cependant, des expériences doivent être menées afin de vérifier ces hypothèses.

Dans le passé, il a été démontré que la formule probiotique Bio-K+ inhibe la croissance de *C. difficile* et la sécrétion des toxines A et B selon un mécanisme non-spécifique, c'est-à-dire via l'acidification du milieu de culture (Gunaratnam *et al.*, 2021). Cependant, l'inhibition de la sécrétion des toxines A et B a également été observée dans des essais de co-culture et ce, même lorsque le milieu de culture est tamponné. Dans cette étude, une réduction de la toxine A de *C. difficile* dans le milieu tamponné a été observée, cependant l'expression des gènes *tcdA* et *tcdB* n'a pas été modulée lors de l'étude transcriptomique. Chez d'autres bactéries tel que *C. jejuni*, la régulation des facteurs de virulence n'est pas contrôlée par l'opéron flagellaire. Cependant, il a été démontré que la sécrétion de protéines de virulence dépend d'un appareil d'exportation flagellaire fonctionnel (Aubry *et al.*, 2012; Konkel *et al.*, 2004).

Pour *C. difficile*, après la germination, les cellules végétatives doivent pénétrer dans la couche muqueuse et adhérer aux cellules épithéliales coliques sous-jacentes. Les toxines sont ensuite libérées afin d'être absorbées par les récepteurs des cellules épithéliales de l'hôte. Bien que la couche S et les flagelles soient impliqués dans la colonisation, le processus par lequel *C. difficile* détecte ce nouvel environnement et régule l'expression des gènes de virulence, y compris la production et la sécrétion de toxines, est mal compris (Aubry *et al.*, 2012).

Il a été démontré que l'expression des gènes de toxine et l'activité des toxines dans les surnageants de culture sont détectables entre 4 et 7 h et que l'inactivation des gènes du régulon flagellaire a un impact à la fois sur la transcription et l'activité de la toxine à ces stades précoces de la phase de croissance. Cette tendance est également vraie pour les cultures cultivées en phase post stationnaire (24 h) (Aubry *et al.*, 2012). En tant que tel, il semble que la régulation de l'expression des gènes de toxines puisse être un processus beaucoup plus dynamique que ce qui a été rapporté précédemment impliquant le régulon flagellaire au cours de la croissance cellulaire végétative. Le régulon flagellaire ne semble pas avoir modulé directement l'expression des gènes de toxines. Cependant, une analyse protéomique menée par Aubry *et al.* (2012) a démontré que la perturbation du régulon flagellaire n'est pas uniquement limitée à affecter la production de toxines, mais qu'un effet plus global sur la sécrétion de différentes protéines semble se produire (Aubry *et al.*, 2012).

Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de démontrer que la régulation du pH en fermenteur a empêché l'acidification du milieu induite par les souches composant la formule probiotiques Bio-K+. Dans ce modèle, la croissance de *C. difficile* n'a pas été réduite au cours du temps. Il est donc possible d'infirmer une des hypothèses de départ voulant que la présence de lactobacilles inhibe la croissance de *C. difficile* en fermenteur. De plus, les résultats de quantification des toxines A et B démontrent une réduction significative de la toxine A en présence des lactobacilles. Cette étude n'a pas permis de montrer un impact des lactobacilles sur la sécrétion de la toxine B puisque cette dernière a été très faiblement exprimée par *C. difficile*, même lors de la monoculture. L'hypothèse de départ visant à ce que la présence de lactobacilles inhibe la synthèse des toxines de *C. difficile* en fermenteur est donc partiellement confirmée.

L'optimisation du protocole d'extraction d'ARN a permis l'obtention d'échantillons d'ARN avec une intégrité supérieure à 7 et exempts de contaminants afin de réaliser une étude transcriptomique. Cette analyse a permis l'observation de la modulation des gènes de *C. difficile* en présence des souches probiotiques. Les gènes de toxines *tcdA* et *tcdB* présents sur le locus de pathogénicité PaloC n'ont pas été modulés lors de l'étude transcriptomique. Cependant, il est très intéressant de constater que de nombreux gènes directement liés à la virulence de *C. difficile* ont été sous exprimés en présence des souches probiotiques. L'ensemble des gènes flagellaires dont l'expression a été modulée ont été sous-exprimés en présence des lactobacilles, ce qui impacte la motilité, mais également d'autres volets de la pathogénicité de *C. difficile*, tel que la formation du biofilm. Il a également été mis en évidence que les lactobacilles testés pouvaient avoir un rôle dans la survie des spores, la formation du cortex, la résistance chimique et le potentiel germinatif des spores, qui sont des éléments essentiels pour la virulence de *C. difficile*. Les souches probiotiques testées ont également affecté l'expression de gènes liés à la conjugaison bactérienne et au QS de *C. difficile*, deux composants essentiels dans la virulence de la bactérie. Ainsi, l'étude transcriptomique des essais de fermentation apporte des indices quant aux nouveaux mécanismes d'action potentiels des souches probiotiques Bio-K+. D'autres études cellulaires et chez l'humain doivent être réalisés pour confirmer ces faits. Néanmoins, ces découvertes peuvent expliquer comment les souches probiotiques Bio-K+ permettent de réduire la virulence de *C. difficile* et réduire les symptômes des ICD. L'hypothèse de départ visant à ce que la présence de lactobacilles inhibe l'expression de gènes de virulence de *C. difficile* est donc confirmée.

D'autres études faisant intervenir la comparaison de l'expression des gènes de virulence de *C. difficile* en présence de différentes concentrations des souches probiotiques testées permettraient d'évaluer la modulation des gènes de virulence de *C. difficile* dans différentes conditions. En effet chez *C. difficile*, il a récemment été établi qu'il n'existait pas de relation dose-réponse au niveau transcriptionnel pour certains types de probiotiques. Une analyse transcriptomique portant sur l'expression des gènes de *C. difficile* exposé à différentes doses de *Bifidobacterium breve* a mis en évidence que c'était la faible dose de probiotiques qui permettait la sous expression des gènes de toxines (Yang *et al.*, 2020).

L'évaluation de la mesure de la modulation de l'expression des gènes des trois lactobacilles permettrait d'étudier l'impact que pourrait avoir *C. difficile* sur les souches probiotiques. En effet, lors des essais de fermentation, les trois souches de lactobacilles ont été cultivées en co-culture en présence et en absence *C. difficile*. L'analyse transcriptomique a permis d'obtenir les séquences des trois souches probiotiques seules et en présence de *C. difficile*. L'évaluation bio-informatique de ces séquences permettrait d'étudier l'impact en co-culture de *C. difficile* sur la modulation des gènes des lactobacilles.

Annexes

Annexe 1 : Tableau montrant le nom des gènes liés au transport et au métabolisme des sucres dont l'expression a été modulée à la baisse en présence des souches probiotiques lors de l'étude transcriptomique.

Gene ID	Log 2 FC	P-value	Protéine
CDIF27147_RS01600	-5,42217	4,70E-17	PTS sugar transporter subunit IIA
CDIF27147_RS16110	-1,41486	0,0016315	PTS glucose transporter subunit IIA
CDIF27147_RS04175	-4,44346	0,0220234	PTS glucitol/sorbitol transporter subunit IIA
CDIF27147_RS15860	-1,44046	0,0425596	PTS 2-O-a-mannosyl-D-glycerate transporter subunit IIABC
CDIF27147_RS04170	-3,72111	2,356E-09	PTS glucitol/sorbitol transporter subunit IIB
CDIF27147_RS01615	-4,05988	2,55E-09	PTS fructose-like transporter subunit IIB
CDIF27147_RS04165	-3,16692	2,481E-06	PTS sorbose transporter subunit IIB
CDIF27147_RS12210	-3,32286	7,596E-06	PTS sugar transporter subunit IIB
CDIF27147_RS13945	-2,6594	2,233E-05	glucose-specific PTS transporter subunit IIBC
CDIF27147_RS14460	-1,56945	0,0002066	Cof-type HAD-IIB family hydrolase
CDIF27147_RS15475	-1,62083	0,0064062	PTS fructose transporter subunit IIB
CDIF27147_RS01610	-4,54348	2,329E-19	PTS fructose transporter subunit EIIC
CDIF27147_RS15875	-3,28776	2,339E-19	PTS transporter subunit EIIC
CDIF27147_RS12250	-3,72299	8,398E-11	PTS mannitol transporter subunit IICB
CDIF27147_RS04160	-3,3676	9,802E-11	PTS glucitol/sorbitol transporter subunit IIC
CDIF27147_RS12205	-4,30411	2,957E-08	PTS galactitol transporter subunit IIC
CDIF27147_RS15115	-1,02469	0,0249612	PTS sugar transporter subunit IIC
CDIF27147_RS12245	-3,87306	5,726E-20	BglG family transcription antiterminator
CDIF27147_RS14420	-1,25391	0,0014558	HPr family phosphocarrier protein
CDIF27147_RS02095	-2,4452	4,929E-06	Lacl family DNA-binding transcriptional regulator
CDIF27147_RS02110	-2,51669	3,094E-06	sugar ABC transporter ATP-binding protein
CDIF27147_RS04725	-3,55498	5,184E-06	ATP-binding cassette domain-containing protein
CDIF27147_RS13960	-2,07996	9,749E-06	dipeptide ABC transporter ATP-binding protein
CDIF27147_RS11160	-2,22929	4,561E-05	ABC transporter ATP-binding protein
CDIF27147_RS12905	-1,65998	0,0020076	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC
CDIF27147_RS17350	-1,91389	0,0065725	ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein
CDIF27147_RS11520	-0,68588	0,0318154	amino acid ABC transporter ATP-binding protein
CDIF27147_RS05875	-2,60821	0,0024782	gamma-glutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase family protein
CDIF27147_RS13980	-1,73707	5,197E-07	ABC transporter permease
CDIF27147_RS04715	-3,37711	6,844E-06	ABC transporter
CDIF27147_RS04615	-1,98741	9,206E-06	ABC transporter substrate-binding protein
CDIF27147_RS17525	-2,39494	0,0001274	carbohydrate ABC transporter permease
CDIF27147_RS16165	-1,41398	0,0005434	iron ABC transporter permease
CDIF27147_RS11535	-1,02503	0,0014886	amino acid ABC transporter permease
CDIF27147_RS12905	-1,65998	0,0020076	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC
CDIF27147_RS02115	-1,43763	0,0024054	ribose ABC transporter permease
CDIF27147_RS16935	-1,87581	0,0049539	phosphate ABC transporter permease subunit PstC
CDIF27147_RS16930	-1,73492	0,0088289	phosphate ABC transporter permease PstA

CDIF27147_RS15335	-1,03365	0,0094727	NrtA/SsuA/CpmA family ABC transporter substrate-binding protein
CDIF27147_RS05125	-1,45123	0,0172932	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein
CDIF27147_RS16975	-0,90913	0,0197298	phosphate ABC transporter substrate-binding protein
CDIF27147_RS07400	-1,68448	0,0041951	ferrous iron transport protein B
CDIF27147_RS07605	-2,24377	0,0166724	ferrous iron transport protein A
CDIF27147_RS13990	-3,60206	0,0237833	acetyl-CoA C-acetyltransferase
CDIF27147_RS02450	-1,30542	0,0234827	isocaprenoyl-CoA:2-hydroxyisocaproate CoA-transferase HadA
CDIF27147_RS01170	-0,99723	0,0195893	thiosulfate sulfurtransferase
CDIF27147_RS08895	-2,93891	0,0349636	sulfur carrier protein ThiS
CDIF27147_RS08345	-2,04143	7,367E-05	serine O-acetyltransferase
CDIF27147_RS02605	-2,28579	1,591E-07	AAA family ATPase
CDIF27147_RS01165	-1,48092	0,0005155	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)
CDIF27147_RS13085	-2,04918	8,071E-09	mannose-6-phosphate isomerase, class I
CDIF27147_RS07575	-1,34602	0,0004131	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
CDIF27147_RS08120	-2,53711	2,498E-06	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
CDIF27147_RS00875	-2,45135	6,756E-06	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase CwID
CDIF27147_RS07570	-1,58556	4,586E-05	pantoate--beta-alanine ligase
CDIF27147_RS07025	-2,6271	0,0001083	D-alanine--D-alanine ligase
CDIF27147_RS04945	-1,95875	0,0009778	alanine--glyoxylate aminotransferase family protein
CDIF27147_RS18155	-0,81078	0,019499	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase
CDIF27147_RS08860	-0,85725	0,031485	alanine:cation symporter family protein
CDIF27147_RS11360	-1,6877	0,0378333	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
CDIF27147_RS02895	-0,95301	0,0386882	AbgT family transporter
CDIF27147_RS13935	-1,53716	0,0002068	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate
CDIF27147_RS18395	-1,3508	0,0005053	glutamate racemase
CDIF27147_RS13220	-1,56281	0,0034976	leucine--tRNA ligase
CDIF27147_RS13685	-1,06595	0,0137626	isoleucine--tRNA ligase
CDIF27147_RS00535	-1,44462	8,796E-05	proline--tRNA ligase
CDIF27147_RS08340	-3,54289	4,582E-10	cysteine synthase A
CDIF27147_RS18580	-1,60432	6,417E-05	S-ribosylhomocysteine lyase
CDIF27147_RS07125	-1,66746	0,0003115	cysteine hydrolase
CDIF27147_RS18570	-1,09762	0,0017604	homocysteine S-methyltransferase family protein
CDIF27147_RS09515	-0,82285	0,0318357	O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase/cysteine
CDIF27147_RS14270	-2,17961	5,186E-06	serine hydroxymethyltransferase
CDIF27147_RS00115	-1,45752	0,0057134	serine--tRNA ligase
CDIF27147_RS08515	-1,39959	0,0161578	serine racemase VanT catalytic subunit
CDIF27147_RS11240	-2,13588	1,192E-05	homoserine kinase
CDIF27147_RS09520	-1,52409	0,0001909	homoserine O-succinyltransferase
CDIF27147_RS08260	-3,04141	0,0005149	homoserine dehydrogenase
CDIF27147_RS12235	-3,5752	8,678E-14	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
CDIF27147_RS12200	-5,15483	1,754E-09	galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
CDIF27147_RS05045	-2,48723	5,004E-09	glucosamine-6-phosphate deaminase
CDIF27147_RS05040	-2,62473	6,466E-09	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
CDIF27147_RS12365	-2,20787	4,936E-07	sugar-phosphatase

CDIF27147_RS12190	-3,37449	1,247E-05	transketolase
CDIF27147_RS16465	-2,06872	1,433E-05	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
CDIF27147_RS01775	-2,18157	2,847E-05	glycosyltransferase
CDIF27147_RS18945	-2,11593	0,0001326	sugar kinase
CDIF27147_RS12175	-2,77822	0,0002044	ribulose-phosphate 3-epimerase
CDIF27147_RS16135	-2,37485	0,0002228	family 1 glycosylhydrolase
CDIF27147_RS04180	-3,11768	3,723E-06	sorbitol-6-phosphate dehydrogenase
CDIF27147_RS04500	-2,34736	3,836E-06	homocitrate synthase
CDIF27147_RS01700	-1,301	0,0052081	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
CDIF27147_RS17060	-0,93626	0,005243	glucose-6-phosphate isomerase
CDIF27147_RS15490	-1,74481	0,0438312	glucose uptake protein

CDIF27147_RS18545	-1,73057	0,0004746	glutamine-hydrolyzing carbamoyl-phosphate synthase small subunit
CDIF27147_RS17985	-1,07215	0,0060824	peptide chain release factor N(5)-glutamine methyltransferase
CDIF27147_RS15885	-4,83953	5,362E-28	alpha,alpha-phosphotrehalase
CDIF27147_RS15060	-5,73453	1,19E-21	UxA family hydrolase
CDIF27147_RS16105	-1,69566	6,83E-05	6-phospho-beta-glucosidase
CDIF27147_RS04510	-1,58064	0,0001994	isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase family protein
CDIF27147_RS12175	-2,77822	0,0002044	ribulose-phosphate 3-epimerase
CDIF27147_RS16135	-2,37485	0,0002228	family 1 glycosylhydrolase
CDIF27147_RS12180	-2,97737	0,000315	ribose 5-phosphate isomerase B
CDIF27147_RS04505	-1,59532	0,0004403	aconitate hydratase

CDIF27147_RS07845	-2,58537	0,0006487	biosynthetic-type acetolactate synthase large subunit
CDIF27147_RS02100	-2,1145	0,0009117	ribokinase
CDIF27147_RS16130	-2,60047	0,0009181	glycoside hydrolase family 65 protein
CDIF27147_RS11970	-1,54334	0,0059994	1-phosphofructokinase
CDIF27147_RS00480	-1,08716	0,0488587	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2
CDIF27147_RS04445	-0,7156	0,0490233	HAMP domain-containing histidine kinase
CDIF27147_RS06315	-1,56998	0,0027194	sensor histidine kinase
CDIF27147_RS11200	-0,87475	0,0093345	two-component sensor histidine kinase
CDIF27147_RS17705	-1,82981	0,0238473	BglG family transcription antiterminator

Annexe 2 : Tableau montrant le nom des gènes liés aux protéines chaperones dont l'expression a été modulée en présence des souches probiotiques lors de l'étude transcriptomique.

Gene ID	Gene	Log 2 FC	P-value	Protéine
CDIF27147_RS01540	<i>groel</i>	-1,0083	0,01	chaperonin GroEL
CDIF27147_RS01965	<i>htpG</i>	-1,6636	2,38E-05	molecular chaperone HtpG
CDIF27147_RS12925	<i>dnaj</i>	-1,37599	0,005617	molecular chaperone DnaJ
CDIF27147_RS12930	<i>dnak</i>	-1,29713	0,007207	molecular chaperone DnaK
CDIF27147_RS06005	<i>spo0A</i>	1,058522	1,16E-03	sporulation transcription factor Spo0A
CDIF27147_RS12935	<i>grpE</i>	-1,47135	0,003193	nucleotide exchange factor GrpE

Annexe 3 : Tableau montrant le nom des gènes liés aux protéines des toxines dont l'expression a été modulée en présence des souches probiotiques lors de l'étude transcriptomique.

Gene ID	Gene	Log 2 FC	P-value	Protéine
CDIF27147_RS13630	<i>cdta</i>	1,750163	7,52E-06	ADP-ribosylating binary toxin CdtA
CDIF27147_RS13635	<i>cdtb</i>	2,364957	5,38E-12	ADP-ribosylating binary toxin binding CdtB

Annexe 4 : Tableau montrant le nom des gènes liés aux protéines du QS dont l'expression a été modulée en présence des souches probiotiques lors de l'étude transcriptomique.

Gene ID	Gene	Log 2 FC	P-value	Protéine
CDIF27147_RS18580	<i>luxS</i>	-1,60432	6,42E-05	S-ribosylhomocysteine lyase
CDIF27147_RS11690	-	1,022812	0,02	AI-2E family transporter
CDIF27147_RS12455	-	0,922476	0,03	AI-2E family transporter
CDIF27147_RS06005	<i>spo0A</i>	1,058522	1,16E-03	sporulation transcription factor Spo0A

Annexe 5 : Tableau montrant le nom des gènes liés aux protéines de sporulation dont l'expression a été modulée en présence des souches probiotiques lors de l'étude transcriptomique.

Gene ID	Gene	Log 2 FC	P-value	Protéine
CDIF27147_RS05845	-	-1,77159	8,66E-08	3-oxoacyl
CDIF27147_RS06005	<i>spo0A</i>	1,058522	1,16E-03	sporulation transcription factor Spo0A
CDIF27147_RS12830	<i>YqfD</i>	-1,0941	0,01	sporulation protein YqfD
CDIF27147_RS18015	<i>spolE</i>	-1,63096	0,01	stage II sporulation protein E
CDIF27147_RS18060	<i>spoVT</i>	-3,62354	0,02	stage V sporulation protein T
CDIF27147_RS03270	<i>cotJA</i>	-2,59828	0,03	spore coat associated protein CotJA
CDIF27147_RS13740	<i>spoIVA</i>	4,125773	4,63E-03	stage IV sporulation protein A
CDIF27147_RS00605	<i>sigH</i>	1,090304	4,83E-03	RNA polymerase sporulation sigma factor SigH
CDIF27147_RS16865	-	2,090057	0,01	alpha/beta-type small acid-soluble spore protein
CDIF27147_RS01975	-	0,835853	0,01	spore photoproduct lyase
CDIF27147_RS13875	<i>spoVE</i>	0,626412	0,03	stage V sporulation protein E
CDIF27147_RS10325	<i>spoVS</i>	1,022867	0,01	stage V sporulation protein S

Annexe 6 : Tableau montrant le nom des gènes liés aux protéines d'adhérence dont l'expression a été modulée en présence des souches probiotiques lors de l'étude transcriptomique.

Gene ID	Gene	Log 2 FC	P-value	Protéine
CDIF27147_RS14635	<i>cwp8</i>	-2,0526	2,48E-06	cell wall-binding protein Cwp8
CDIF27147_RS14605	<i>slpA</i>	0,668061	0,02	S-layer protein SlpA
CDIF27147_RS09400	<i>cwp23</i>	1,401665	1,44E-03	cell wall-binding protein Cwp23
CDIF27147_RS10605	<i>cwp28</i>	2,084904	2,70E-03	cell wall-binding protein Cwp28
CDIF27147_RS09130	<i>cwp13</i>	1,026042	3,83E-03	cell wall-binding cysteine protease Cwp13
CDIF27147_RS14575	<i>cwp84</i>	0,810868	0,01	cell wall-binding cysteine protease Cwp84
CDIF27147_RS14550	<i>cwp7</i>	0,938803	1,00E-02	cell wall-binding protein Cwp7
CDIF27147_RS14320	<i>cwp14</i>	0,771272	1,00E-02	cell wall-binding protein Cwp14
CDIF27147_RS06100	<i>cwp26</i>	1,145428	1,00E-02	cell wall-binding protein Cwp26
CDIF27147_RS05245	<i>cwp18</i>	0,989693	1,00E-02	cell wall-binding protein Cwp18
CDIF27147_RS14615	<i>cwp11</i>	0,693606	3,00E-02	cell wall-binding protein Cwp11
CDIF27147_RS14180	<i>cwp22</i>	0,837103	3,00E-02	cell wall-binding protein Cwp22

Annexe 7 : Tableau montrant le nom des gènes liés aux protéines flagellaires dont l'expression a été modulée en présence des souches probiotiques lors de l'étude transcriptomique.

Gene ID	Gene	Log 2 FC	P-value	Protéine
CDIF27147_RS01770	<i>fliC</i>	-2,3574	1,35E-06	flagellin
CDIF27147_RS01825	<i>fliE</i>	-1,47321	5,34E-05	flagellar hook-basal body complex protein FliE
CDIF27147_RS01845	<i>fliI</i>	-1,39615	1,16E-03	flagellar protein export ATPase FliI
CDIF27147_RS01850	<i>fliJ</i>	-1,3045	2,65E-03	flagellar export protein FliJ
CDIF27147_RS01840	<i>fliH</i>	-1,41449	3,56E-03	flagellar assembly protein FliH
CDIF27147_RS01815	<i>flgB</i>	-1,29193	6,04E-03	flagellar basal body rod protein FlgB
CDIF27147_RS01855	<i>fliK</i>	-1,34513	0,01	flagellar hook-length control protein FliK
CDIF27147_RS01835	<i>fliG</i>	-1,26098	0,02	flagellar motor switch protein FliG
CDIF27147_RS01830	<i>fliF</i>	-1,08602	0,02	flagellar M-ring protein FliF
CDIF27147_RS01880	<i>motB</i>	-0,9664	0,02	OmpA family protein
CDIF27147_RS01875	<i>motA</i>	-1,02552	0,02	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein
CDIF27147_RS01895	<i>fliP</i>	-0,87246	0,03	flagellar type III secretion system pore FliP
CDIF27147_RS01765	<i>fliT</i>	-1,66354	0,04	flagellar protein FliT
CDIF27147_RS01820	<i>flgC</i>	-1,01213	0,04	flagellar basal body rod protein FlgC
CDIF27147_RS01870	<i>flbD</i>	-1,10666	0,04	flagellar FlbD family protein

Références

- Abt MC, McKenney PT, Pamer EG (2016) *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nature Reviews Microbiology* 14(10):609-620.
- Amir I, Konikoff FM, Oppenheim M, Gophna U, Half EE (2014) Gastric microbiota is altered in oesophagitis and Barrett's oesophagus and further modified by proton pump inhibitors. *Environmental Microbiology* 16(9):2905-2914.
- Anand A & Glatt AE (1993) *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. *Clinical Infectious Diseases* 17(1):109-113.
- Anders S, Pyl P, Huber W (HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181(4096):223-230.
- Angarone M & Ison MG (2015) Diarrhea in solid organ transplant recipients. *Current Opinion in Infectious Diseases* 28(4):308-316.
- 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.
- Antunes A, Martin-Verstraete I, Dupuy B (2011) CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. *Molecular Microbiology* 79(4):882-899.
- Arora G, Sajid A, Virmani R, Singhal A, Kumar CS, Dhasmana N, Khanna T, Maji A, Misra R, Molle V (2017) Ser/Thr protein kinase PrkC-mediated regulation of GroEL is critical for biofilm formation in *Bacillus anthracis*. *NPJ Biofilms and Microbiomes* 3(1):1-12.
- Aubry A, Hussack G, Chen W, KuoLee R, Twine SM, Fulton KM, Foote S, Carrillo CD, Tanha J, Logan SM (2012) Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity* 80(10):3521-3532.
- 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. *Clinical Infectious Diseases* 60(suppl_2):S135-S143.
- Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR, Kansau I, Collignon A, Minton NP (2013) The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PloS one* 8(9):e73026.
- Bafeta A, Yavchitz A, Riveros C, Batista R, Ravaud P (2017) Methods and reporting studies assessing fecal microbiota transplantation: a systematic review. *Annals of Internal Medicine* 167(1):34-39.
- Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2016) In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 353(6294).
- Bansal R, Mittapelly P, Cassone BJ, Mamidala P, Redinbaugh MG, Michel A (2015) Recommended reference genes for quantitative PCR analysis in soybean have variable stabilities during diverse biotic stresses. *PloS one* 10(8):e0134890.
- Barbut F, Meynard J-L, Eckert C (2011) Traitement des infections digestives à *Clostridium difficile*: anciennes et nouvelles approches. *Journal des Anti-Infectieux* 13(2):74-86.
- Barketi-Klai A (2012) *Clostridium difficile* : étude du processus de colonisation et d'hypervirulence de la souche épidémique O27. Thesis.
- Barnett (2012) *Clostridium difficile*: a new look at an old but increasingly deadly infection. *Journal of the American Academy of PAs* 25(1):32-36.
- Batah J & Kansau I (2016) Intestinal epithelial cell response to *Clostridium difficile* flagella. *Clostridium difficile*, Springer. p 103-116.
- Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, L'Ecuyer A, Savoie M, Franco M, Lachaine J, Weiss K (2007) Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* Cl1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Journal of Gastroenterology* 21(11):732-736.

- Berings M, Karaaslan C, Altunbulakli C, Gevaert P, Akdis M, Bachert C, Akdis CA (2017) Advances and highlights in allergen immunotherapy: on the way to sustained clinical and immunologic tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140(5):1250-1267.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A (2012) Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism* 61(2):160-174.
- Bhangu A, Nepogodiev D, Gupta A, Torrance A, Singh P (2012) Systematic review and meta-analysis of outcomes following emergency surgery for *Clostridium difficile* colitis. *Journal of British Surgery* 99(11):1501-1513.
- Bishop KD & Castillo JJ (2012) Risk factors associated with *Clostridium difficile* infection in adult oncology patients with a history of recent hospitalization for febrile neutropenia. *Leukemia & Lymphoma* 53(8):1617-1619.
- Bordeleau E, Purcell EB, Lafontaine DA, Fortier L-C, Tamayo R, Burrus V (2015) Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* 197(5):819-832.
- Borody TJ & Khoruts A (2012) Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9(2):88-96.
- Bouillaut L, Dubois T, Sonenshein AL, Dupuy B (2015) Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Research in Microbiology* 166(4):375-383.
- Bramley HF & Kornberg HL (1987) Sequence homologies between proteins of bacterial phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase systems: identification of possible phosphate-carrying histidine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(14):4777-4780.
- Brandt EG, Hellgren M, Brinck T, Bergman T, Edholm O (2009) Molecular dynamics study of zinc binding to cysteines in a peptide mimic of the alcohol dehydrogenase structural zinc site. *Physical Chemistry Chemical Physics* 11(6):975-983.
- Britton RA & Versalovic J (2008) Probiotics and gastrointestinal infections. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2008.
- Brown KA, Khanafer N, Daneman N, Fisman DN (2013) Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(5):2326-2332.
- Bukau B & Walker GC (1990) Mutations altering heat shock specific subunit of RNA polymerase suppress major cellular defects of *E. coli* mutants lacking the DnaK chaperone. *The European Molecular Biology Organisation Journal* 9(12):4027-4036.
- Burkholder KM & O'Riordan MX (2016) Opportunistic Pathogens of Humans. *The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic*, Springer. p 301-357.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2):169-193.
- Buyse S, Azoulay E, Barbut F, Schlemmer B (2005) Infection à *Clostridium difficile*: physiopathologie, diagnostic et traitement. *Réanimation* 14(4):255-263.
- Carter GP, Rood JI, Lyras D (2010) The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. *Gut Microbes* 1(1):58-64.
- Carter GP, Rood JI, Lyras D (2012) The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends in Microbiology* 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 (2019) Centers for Disease Control and Prevention <https://www.cdc.gov>
- Cheetham ME & Caplan AJ (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones* 3(1):28.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1):156-159.

- Chopra T, Alangaden GJ, Chandrasekar P (2010) *Clostridium difficile* infection in cancer patients and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 8(10):1113-1119.
- Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN (1992) Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *Journal of Infectious Diseases* 166(3):561-567.
- Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K, Sears P, Gorbach S, Group O--CS (2012) Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* 12(4):281-289.
- Cornely OA, Miller MA, Fantin B, Mullane K, Kean Y, Gorbach S (2013) Resolution of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in patients with cancer treated with fidaxomicin or vancomycin. *Journal of Clinical Oncology* 31(19):2493-2499.
- Cornely OA, Nathwani D, Ivanescu C, Odufowora-Sita O, Retsa P, Odeyemi IA (2014) Clinical efficacy of fidaxomicin compared with vancomycin and metronidazole in *Clostridium difficile* infections: a meta-analysis and indirect treatment comparison. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(11):2892-2900.
- Cózar-Llistó A, Ramos-Martinez A, Cobo J (2016) *Clostridium difficile* infection in special high-risk populations. *Infectious Diseases and Therapy* 5(3):253-269.
- Crobach M, Jea (2016) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology Infection* 5(3):253-269.
- Cundy AS & Shin G (2017) *Découvrir la biologie*. De Boeck Supérieur. Thesis.
- Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N (2003) Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. *Journal of Hospital Infection* 54(3):243-245.
- Cyr DM, Langer T, Douglas MG (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends in Biochemical Sciences* 19(4):176-181.
- Czepiel J, Drózd M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, Goldman S, Wultańska D, Garlicki A, Biesiada G (2019) *Clostridium difficile* infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 38(7):1211-1221.
- Daou N, Wang Y, Levnikov VM, Nandakumar M, Livny J, Bouillaut L, Blagova E, Zhang K, Belitsky BR, Rhee K (2019) Impact of CodY protein on metabolism, sporulation and virulence in *Clostridioides difficile* ribotype 027. *PLoS one* 14(1):e0206896.
- Đapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M (2013) Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* 195(3):545-555.
- Deakin LJ, Clare S, Fagan RP, Dawson LF, Pickard DJ, West MR, Wren BW, Fairweather NF, Dougan G, Lawley TD (2012) The *Clostridium difficile* *spo0A* gene is a persistence and transmission factor. *Infection and Immunity* 80(8):2704-2711.
- Debast SB, Bauer, M. P. & Kuijper, E. J. (2014) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology Infection* 20(Suppl. 2), 1–26.
- Delaney JM (1990) A *grpE* mutant of *Escherichia coli* is more resistant to heat than the wild-type. *Microbiology* 136(5):797-801.
- Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hebraud M (2006) Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiology Letters* 256(1):1-15.
- Deutscher J, Aké FMD, Derkaoui M, Zébré AC, Cao TN, Bouraoui H, Kentache T, Mokhtari A, Milohanic E, Joyet P (2014) The bacterial phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78(2):231-256.

- Didari T, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M (2015) Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 21(10):3072.
- Dineen SS, Villapakkam AC, Nordman JT, Sonenshein AL (2007) Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Molecular Microbiology* 66(1):206-219.
- Dingle T, Wee S, Mulvey GL, Greco A, Kitova EN, Sun J, Lin S, Klassen JS, Palcic MM, Ng KK (2008) Functional properties of the carboxy-terminal host cell-binding domains of the two toxins, TcdA and TcdB, expressed by *Clostridium difficile*. *Glycobiology* 18(9):698-706.
- Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD (2011) Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and Immunity* 79(10):4061-4067.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1):15-21.
- Dobson CM & Ellis RJ (1998) Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *The European Medical Biology Organization Journal* 17(18):5251-5254.
- Donnelly JP, Wang HE, Locke JE, Mannon RB, Safford MM, Baddley JW (2015) Hospital-onset *Clostridium difficile* infection among solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 15(11):2970-2977.
- Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G (2013) Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology* 53(1):1-8.
- Dupuy B & Sonenshein AL (1998) Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Molecular Microbiology* 27(1):107-120.
- Dutta SK, Girotra M, Garg S, Dutta A, von Rosenvinge EC, Maddox C, Song Y, Bartlett JG, Vinayek R, Fricke WF (2014) Efficacy of combined jejunal and colonic fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12(9):1572-1576.
- Eaton K, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infection and Immunity* 64(7):2445-2448.
- Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell KJF, Aktories K (2007) Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *Journal of Biological Chemistry* 282(35):25314-25321.
- Ellis RJ & Minton AP (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biological Chemistry* 387(5):485-97
- Fan F, Ohnishi K, Francis NR, Macnab RM (1997) The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Molecular Microbiology* 26(5):1035-1046.
- FAO/WHO J (2002) Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food (*World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the human health*).
- Fletcher JR, Erwin S, Lanzas C, Theriot CM (2018) Shifts in the gut metabolome and *Clostridium difficile* transcriptome throughout colonization and infection in a mouse model. *MSphere* 3(2):e00089-00018.
- Fuller R (1991) Probiotics in human medicine. *Gut* 32(4):439.
- 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 Diarrhea and *Clostridium difficile* Diarrhea Prophylaxis in Adult Patients. *Official Journal of the American College of Gastroenterology/ ACG* 105(7):1636-1641.

- Garzotto AR, García AM, Unceta NM, Lopez MMG, Orellana-Miguel MÁ, Díaz-García CV, Cortijo-Cascajares S, Cortes-Funes H, Agulló-Ortuño MT (2015) Risk factors associated with *Clostridium difficile* infection in adult oncology patients. *Supportive Care in Cancer* 23(6):1569-1577.
- Georgescauld F, Popova K, Gupta AJ, Bracher A, Engen JR, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2014) GroEL/ES chaperonin modulates the mechanism and accelerates the rate of TIM-barrel domain folding. *Cell* 157(4):922-934.
- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K (2014) *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 5(1):15-27.
- Ghoury YA, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPont AW (2014) Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 7:473.
- Goldberg EJ, Bhalodia S, Jacob S, Patel H, Trinh KV, Varghese B, Yang J, Young SR, Raffa RB (2015) *Clostridium difficile* infection: A brief update on emerging therapies. *American Journal of Health-System Pharmacy* 72(12):1007-1012.
- Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CKF, Beardsley J, Mertz D, Johnston BC (2017) Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (12).
- GS B & AJ K (1958) Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 44(5):854-859.
- Guery B, Menichetti F, Anttila V-J, Adomakoh N, Aguado JM, Bisnauthsing K, Georgopali A, Goldenberg SD, Karas A, Kazeem G (2018) Extended-pulsed fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection in patients 60 years and older (EXTEND): a randomised, controlled, open-label, phase 3b/4 trial. *The Lancet Infectious Diseases* 18(3):296-307.
- Gunaratnam S (2019) Inhibition des facteurs de virulence de *Clostridioides difficile* par les probiotiques *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R et *L. rhamnosus* CLR2. Thesis.
- Gunaratnam S, Diarra C, Paquette PD, Ship N, Millette M, Lacroix M (2021) The Acid-Dependent and Independent Effects of *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lacticaseibacillus casei* LBC80R, and *Lacticaseibacillus rhamnosus* CLR2 on *Clostridioides difficile* R20291. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* :1-8.
- Hafiz S & Oakley C (1976) *Clostridium difficile*: isolation and characteristics (Plate VIII). *Journal of Medical Microbiology* 9(2):129-136.
- Hall IC & O'toole E (1935) Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *American Journal of Diseases of Children* 49(2):390-402.
- Hautmann MG, Hipp M, Kölbl O (2011) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in radiooncology: an underestimated problem for the feasibility of the radiooncological treatment? *Radiation Oncology* 6(1):1-7.
- He M, Sebahia M, Lawley TD, Stabler RA, Dawson LF, Martin MJ, Holt KE, Seth-Smith HM, Quail MA, Rance R (2010) Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(16):7527-7532.
- Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN, Shanman R, Johnsen B, Shekelle PG (2012) Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association* 307(18):1959-1969.
- Hennequin C, Collignon A, Karjalainen T (2001a) Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. *Microbial Pathogenesis* 31(5):255-260.
- Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A-J, Collignon A, Barc M-C, Bourlioux P, Karjalainen T (2001b) GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* 147(1):87-96.
- Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ (2012a) Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(3):742-748.

- Hensgens MP, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MG, de Boer E, Lipman LJ, Kuijper EJ (2012b) *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection* 18(7):635-645.
- Hickson M (2011) Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 4(3):185-197.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S (2014) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Hofmann JD, Otto A, Berges M, Biedendieck R, Michel A-M, Becher D, Jahn D, Neumann-Schaal M (2018) Metabolic reprogramming of *Clostridioides difficile* during the stationary phase with the induction of toxin production. *Frontiers in Microbiology* 9:1970.
- Honoré F (2017) Étude du chaperon moléculaire Hsp90 chez la bactérie modèle *Shewanella oneidensis*. Thesis.
- Huang CJ & Barrett EL (1991) Sequence analysis and expression of the *Salmonella typhimurium* *asr* operon encoding production of hydrogen sulfide from sulfite. *Journal of Bacteriology* 173(4):1544-1553.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N & Robert-Baudouy J (1981) Isolation of fusions between the lac genes and several genes of the exu regulon: analysis of their regulation, determination of the transcription direction of the *uxaC-uxaA* operon, in *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics MGG* 182(2):279-287.
- Hung Y-P, Lin H-J, Wu T-C, Liu H-C, Lee J-C, Lee C-I, Wu Y-H, Wan L, Tsai P-J, Ko W-C (2013) Risk factors of fecal toxigenic or non-toxigenic *Clostridium difficile* colonization: impact of Toll-like receptor polymorphisms and prior antibiotic exposure. *PLoS one* 8(7):e69577.
- Hunt JJ & Ballard JD (2013) Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(4):567-581.
- Jennison AV & Verma NK (2004) *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiology Reviews* 28(1):43-58.
- 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* 6(4):1347-1360.
- Johnson S, Gerding DN, Olson MM, Weiler MD, Hughes RA, Clabots CR, Peterson LR (1990) Prospective, controlled study of vinyl glove use to interrupt *Clostridium difficile* nosocomial transmission. *The American Journal of Medicine* 88(2):137-140.
- Karas J, Enoch D, Aliyu S (2010) A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. *Journal of Infection* 61(1):1-8.
- Karlsson S, Burman LG, Åkerlund T (1999) Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiology* 145(7):1683-1693.
- Kawarizadeh A, Nojoomi F, Tabatabaei M, Hosseinzadeh S, Farzaneh M (2019) The effect of *Bacillus coagulans* on cytotoxicity and apoptosis induced by *Salmonella Typhimurium* in HT-29 cell culture. *Iranian Journal of Microbiology* 11(4):305.
- Kazamias MT & Sperry JF (1995) Enhanced fermentation of mannitol and release of cytotoxin by *Clostridium difficile* in alkaline culture media. *Applied and Environmental Microbiology* 61(6):2425-2427.
- Khanafer N, Vanhems P, Barbut F, Luxemburger C, Group CS (2017) Factors associated with *Clostridium difficile* infection: a nested case-control study in a three year prospective cohort. *Anaerobe* 44:117-123.
- Khanafer N, Voirin N, Barbut F, Kuijper E, Vanhems P (2015) Hospital management of *Clostridium difficile* infection: a review of the literature. *Journal of Hospital Infection* 90(2):91-101.
- Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, Sauver JLS, Harmsen WS, Zinsmeister AR (2012) The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *The American Journal of Gastroenterology* 107(1):89.

- Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* 82:323-355.
- Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J (2004) Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of bacteriology* 186(11):3296-3303.
- Kozera B & Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics* 54(4):391-406.
- Ladd AM, Panagopoulos G, Cohen J, Mar N, Graham R (2014) Potential costs of inappropriate use of proton pump inhibitors. *The American Journal of the Medical Sciences* 347(6):446-451.
- LaFrance ME, Farrow MA, Chandrasekaran R, Sheng J, Rubin DH, Lacy DB (2015) Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(22):7073-7078.
- Lagarde A & Stoeber F (1977) *Escherichia coli* K-12 structural kdgT mutants exhibiting thermosensitive 2-keto-3-deoxy-D-gluconate uptake. *Journal of Bacteriology* 129(2):606-615.
- Lam TI, Tam CC, Stanker LH, Cheng LW (2016) Probiotic microorganisms inhibit epithelial cell internalization of botulinum neurotoxin serotype A. *Toxins* 8(12):377.
- Lawley TD, Croucher NJ, Yu L, Clare S, Sebahia M, Goulding D, Pickard DJ, Parkhill J, Choudhary J, Dougan G (2009) Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *Journal of Bacteriology* 191(17):5377-5386.
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM (2016) Reclassification of *clostridium difficile* as *clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40:95-99.
- Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C (2014) Tolérance des biofilms aux antibiotiques: comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-Infectieux* 16(3):112-121.
- Leffler DA & Lamont JT (2015) *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine* 372(16):1539-1548.
- Loo VG, Bourgault A-M, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R (2011) Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *New England Journal of Medicine* 365(18):1693-1703.
- Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue Y-K (2011) Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine* 364(5):422-431.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12):1-21.
- Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, Nichol G, Thomas Jr WD, Leney M, Sloan S (2010) Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *New England Journal of Medicine* 362(3):197-205.
- Martin-Verstraete I, Peltier J, Dupuy B (2016) The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis. *Toxins* 8(5):153.
- Maziade P-J, Andriessen J, Pereira P, Currie B, Goldstein E (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.
- McBride SM & Sonenshein AL (2011) Identification of a genetic locus responsible for antimicrobial peptide resistance in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity* 79(1):167-176.
- McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould CV, Kelly C (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). *Clinical Infectious Diseases* 66(7):e1-e48.
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens Jr RC, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine* 353(23):2433-2441.

- Meyer R (2009) Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* 62(2):57-70.
- Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A (2007) TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Seminars in Immunopathology*. Springer, p 275-288.
- Minamino T, Chu R, Yamaguchi S, Macnab RM (2000) Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology* 182(15):4207-4215.
- Mion S, Remy B, Plener L, Chabriere E, Daude D (2019) Quorum sensing and quorum quenching: how to disrupt bacterial communication to inhibit virulence? *Medecine Sciences: M/S* 35(1):31-38.
- Moayyedi P, Delaney BC, Vakil N, Forman D, Talley NJ (2004) The efficacy of proton pump inhibitors in nonulcer dyspepsia: a systematic review and economic analysis. *Gastroenterology* 127(5):1329-1337.
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM (2010) The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 59(3):325-332.
- Moore N (2021) Transcriptomic analysis of *Clostridioides difficile* grown in a biologically relevant growth medium. (Ulster University). Thesis.
- Mourez M, Jehanno M, Hofnung M, Dassa E (2000) Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). Thesis
- Na X, Kim H, Moyer MP, Pothoulakis C, LaMont JT (2008) gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. *Infection and Immunity* 76(7):2862-2871.
- Napolitano LM & Edmiston Jr CE (2017) *Clostridium difficile* disease: diagnosis, pathogenesis, and treatment update. *Surgery* 162(2):325-348.
- Neal MD, Alverdy JC, Hall DE, Simmons RL, Zuckerbraun BS (2011) Diverting loop ileostomy and colonic lavage: an alternative to total abdominal colectomy for the treatment of severe, complicated *Clostridium difficile* associated disease. *Annals of Surgery* 254(3):423-429.
- Negm OH, MacKenzie B, Hamed M, Ahmad O, Shone CC, Humphreys D, Ravi Acharya K, Loscher CE, Marszalowska I, Lynch M (2017) Protective antibodies against *Clostridium difficile* are present in intravenous immunoglobulin and are retained in humans following its administration. *Clinical & Experimental Immunology* 188(3):437-443.
- O'Neil HS & Marquis H (2006) *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infection and Immunity* 74(12):6675-6681.
- O'Horo J & Safdar N (2009) The role of immunoglobulin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases* 13(6):663-667.
- Ormonde P, Hörstedt P, O'Toole R, Milton DL (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 182(8):2326-2328.
- Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp TR, Aktories K (2011) Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(39):16422-16427.
- Pappas M, Jolly S, Vijan S (2016) Defining appropriate use of proton-pump inhibitors among medical inpatients. *Journal of General Internal Medicine* 31(4):364-371.
- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA (2014) *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology* 22(7):406-416.
- Paton AW, Morona R, Paton JC (2001) Neutralization of Shiga toxins Stx1, Stx2c, and Stx2e by recombinant bacteria expressing mimics of globotriose and globotetraose. *Infection and Immunity* 69(3):1967-1970.
- Paton AW, Morona R, Paton JC (2006) Designer probiotics for prevention of enteric infections. *Nature Reviews Microbiology* 4(3):193-200.
- Paudel S, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Ziakas PD, Mylonakis E (2015) Prevalence of *Clostridium difficile* infection among solid organ transplant recipients: a meta-analysis of published studies. *PLoS one* 10(4):e0124483.

- Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, Collignon A (2005) Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology* 54(2):193-196.
- Peniche AG, Savidge TC, Dann SM (2013) Recent insights into *Clostridium difficile* pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 26(5):447-453.
- Pettit LJ, Browne HP, Yu L, Smits WK, Fagan RP, Barquist L, Martin MJ, Goulding D, Duncan SH, Flint HJ (2014) Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism. *BMC Genomics* 15(1):1-15.
- Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Allerberger F, Ruppitsch W (2011) Gene scanning of an internalin B gene fragment using high-resolution melting curve analysis as a tool for rapid typing of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Molecular Diagnostics* 13(1):57-63.
- Pinyon RA, Paton JC, Paton AW, Botten JA, Morona R (2004) Refinement of a therapeutic Shiga toxin—Binding probiotic for human trials. *The Journal of Infectious Diseases* 189(9):1547-1555.
- Pituch H, Obuch-Woszczatynski P, Van Den Braak N, Van Belkum A, Kujawa M, Luczak M, Meisel-Mikolajczyk F (2002) Variable flagella expression among clonal toxin A-/B+ *Clostridium difficile* strains with highly homogeneous flagellin genes. *Clinical Microbiology and Infection* 8(3):187-188.
- Planche T, Aghaizu A, Holliman R, Riley P, Poloniecki J, Breathnach A, Krishna S (2008) Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *The Lancet Infectious diseases* 8(12):777-784.
- Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Morón-Calvente V, Sáez-Lara MJ, Ruiz-Bravo A, Jiménez-Valera M, Gil Á, Gómez-Llorente C, Fontana L (2017a) Adamdec1, Ednrb and Ptgs1/Cox1, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains. *Scientific Reports* 7(1):1-10.
- Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Sáez-Lara MJ, Vilchez-Padial LM, Gil Á, Gómez-Llorente C, Fontana L (2017b) Gene expression profiling in the intestinal mucosa of obese rats administered probiotic bacteria. *Scientific Data* 4(1):1-10.
- Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A (2019) Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition* 10(suppl_1):S49-S66.
- Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A (2018) Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. *Nutrients* 10(1):42.
- Pothoulakis C, Castagliuolo I, LaMont JT (1998) Nerves and intestinal mast cells modulate responses to enterotoxins. *Physiology* 13(2):58-63.
- Poutanen SM & Simor AE (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Canadian Medical Association Journal* 171(1):51-58.
- Pozzoni P (2012) Associated Diarrhea in Adult Hospitalized Patients: A Single-Center, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *American Journal of Gastroenterology*: [10 pages], 3 Apr 2012. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2012.56> 803071256. *Reactions* 1405:9.
- Preston K, Krumian R, Hattner J, de Montigny D, Stewart M, Gaddam S (2018) *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes* 9(5):697-706.
- Pruitt RN, Chambers MG, Ng KK-S, Ohi MD, Lacy DB (2010) Structural organization of the functional domains of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(30):13467-13472.
- Putnam EE, Nock AM, Lawley TD, Shen A (2013) SpoIVA and SipL are *Clostridium difficile* spore morphogenetic proteins. *Journal of Bacteriology* 195(6):1214-1225.
- Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Park Y-H (2016) Probiotics and atopic dermatitis: an overview. *Frontiers in Microbiology* 7:507.

- Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schratzenholz A, Schild H, von Eichel-Streiber C (2007) Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 446(7134):415-419.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine* 308(12):681-685.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(2):588-593.
- Rodriguez C, Van Broeck J, Taminiau B, Delmée 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 (2008) *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 198(6):635. e631-635. e636.
- Ruijter JM, Barnewall RJ, Marsh IB, Szentirmay AN, Quinn JC, van Houdt R, Gunst QD, van den Hoff MJ (2021) Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. *Clinical Chemistry* 67(6):829-842.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009) *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 7(7):526-536.
- Ryan KA, Karim N, Worku M, Penn CW, O'Toole PW (2005) Helicobacter pylori flagellar hook-filament transition is controlled by a FliK functional homolog encoded by the gene HP0906. *Journal of Bacteriology* 187(16):5742-5750.
- Salton MR (1952) Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. *Nature* 170(4331):746-747.
- Salton MR (1994) The bacterial cell envelope—a historical perspective. *New Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Vol 27. p 1-22.
- Sammons JS, Toltzis P, Zaoutis TE (2013) *Clostridium difficile* infection in children. *Journal of the American Medical Association pediatrics* 167(6):567-573.
- 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. *Archives of Medical Science: AMS* 6(1):56.
- Saujet L, Monot M, Dupuy B, Soutourina O, Martin-Verstraete I (2011) The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* 193(13):3186-3196.
- Saujet L, Pereira FC, Henriques AO, Martin-Verstraete I (2014) The regulatory network controlling spore formation in *Clostridium difficile*. *Federation of European Microbiology Societies Microbiology Letters* 358(1):1-10.
- Saujet L, Pereira FC, Serrano M, Soutourina O, Monot M, Shelyakin PV, Gelfand MS, Dupuy B, Henriques AO, Martin-Verstraete I (2013) Genome-wide analysis of cell type-specific gene transcription during spore formation in *Clostridium difficile*. *PLoS genetics* 9(10):e1003756.
- Schwan C, Kruppke AS, Nölke T, Schumacher L, Koch-Nolte F, Kudryashev M, Stahlberg H, Aktories K (2014) *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(6):2313-2318.
- Seyler Jr RW, Henriques AO, Ozin AJ, Moran Jr CP (1997) Assembly and interactions of cotJ-encoded proteins, constituents of the inner layers of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Microbiology* 25(5):955-966.
- Shaheen NJ, Hansen RA, Morgan DR, Gangarosa LM, Ringel Y, Thiny MT, Russo MW, Sandler RS (2006) The burden of gastrointestinal and liver diseases, 2006. *American Journal of Gastroenterology* 101(9):2128-2138.
- Shen A (2015) A gut odyssey: the impact of the microbiota on *Clostridium difficile* spore formation and germination. *PLoS Pathogens* 11(10):e1005157.

- Simon MI, Crane BR, Crane A (2007) *Methods in Enzymology: Two-component Signaling Systems, Part C*. Elsevier,
- Simor AE (2010) Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: A review. *Journal of the American Geriatrics Society* 58(8):1556-1564.
- Slater RT, Frost LR, Jossi SE, Millard AD, Unnikrishnan M (2019) *Clostridioides difficile* LuxS mediates inter-bacterial interactions within biofilms. *Scientific Reports* 9(1):1-15.
- Spinler JK, Ross CL, Savidge TC (2016) Probiotics as adjunctive therapy for preventing *Clostridium difficile* infection—What are we waiting for? *Anaerobe* 41:51-57.
- Stabler R, Gerding D, Songer J, Drudy D, Brazier J, Trinh H, Witney A, Hinds J, Wren B (2006) Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *Journal of Bacteriology* 188(20):7297-7305.
- Stabler RA, Valiente E, Dawson LF, He M, Parkhill J, Wren BW (2010) In-depth genetic analysis of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 strains reveals high genome fluidity including point mutations and inversions. *Gut Microbes* 1(4):269-276.
- Stanislawowski M, Wierzbicki P, Golab A, Adrych K, Kartanowicz D, Wypych J, Godlewski J, Smoczynski M, Kmiec Z (2009) Decreased Toll-like receptor-5 (TLR-5) expression in the mucosa of ulcerative colitis patients. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60(Suppl 4):71-75.
- Suárez JM, Edwards AN, McBride SM (2013) The *Clostridium difficile* cpr locus is regulated by a noncontiguous two-component system in response to type A and B lantibiotics. *Journal of Bacteriology* 195(11):2621-2631.
- Sugimoto S, Saruwatari K, Higashi C, Sonomoto K (2008) The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK–DnaJ–GrpE chaperone system and for cell division. *Microbiology* 154(7):1876-1885.
- Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, Garcia RJ, Brandmarker S, Bowen K, Borjal D (2000) The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clinical Infectious Diseases* 31(4):1012-1017.
- Szajewska H (2016) What are the indications for using probiotics in children? *Archives of Disease in Childhood* 101(4):398-403.
- Tan KS, Wee BY, Song KP (2001) Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology* 50(7):613-619.
- Tasteyre A, Barc M-C, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T (2001a) Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infection and Immunity* 69(12):7937-7940.
- Tasteyre A, Barc M-C, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T (2001b) Role of FliC and FliD Flagellar Proteins of *Clostridium difficile* in Adherence and Gut Colonization. *Infection and Immunity* 69(12):7937-7940.
- Tasteyre A, Barc M-C, Karjalainen T, Dodson P, Hyde S, Bourlioux P, Borriello P (2000a) A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF065259 (strain 79-685) and AF077341 (strain VPI 10463). *Microbiology* 146(4):957-966.
- Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, Barc M-C (2000b) Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (*fliC*) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *Journal of Clinical Microbiology* 38(9):3179-3186.
- Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, Barc M-C (2001c) Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *Journal of Clinical Microbiology* 39(3):1178-1183.
- 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.
- Tejero-Sariñena 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.

- Tertrais M (2017) Nouvelles options thérapeutiques et prophylactiques dans les infections à *Clostridium difficile*. Thesis.
- Terveer EM, Van Beurden Y, Goorhuis A, Seegers J, Bauer M, Van Nood E, Dijkgraaf M, Mulder C, Vandenbroucke-Grauls C, Verspaget H (2017) How to: establish and run a stool bank. *Clinical Microbiology and Infection* 23(12):924-930.
- Theeragool G, Miyao A, Yamada K, Sato T, Kobayashi Y (1993) In vivo expression of the *Bacillus subtilis* spoVE gene. *Journal of Bacteriology* 175(13):4071-4080.
- Thomas JG & Baneyx F (1998) Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG in vivo. *Journal of Bacteriology* 180(19):5165-5172.
- Thorens J, Froehlich F, Schwizer W, Saraga E, Bille J, Gyr K, Duroux P, Nicolet M, Pignatelli B, Blum A (1996) Bacterial overgrowth during treatment with omeprazole compared with cimetidine: a prospective randomised double blind study. *Gut* 39(1):54-59.
- Trifan A, Stanciu C, Girleanu I, Stoica OC, Singeap AM, Maxim R, Chiriac SA, Ciobica A, Boiculescu L (2017) Proton pump inhibitors therapy and risk of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *World journal of Gastroenterology* 23(35):6500.
- Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G, Caprioli F, Sonzogni A, Viale G, Rescigno M (2012) Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61(7):1007-1015.
- Twine SM, Reid CW, Aubry A, McMullin DR, Fulton KM, Austin J, Logan SM (2009) Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology* 191(22):7050-7062.
- Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine* 368(5):407-415.
- Ward E, Renault TT, Kim EA, Erhardt M, Hughes KT, Blair DF (2018) Type-III secretion pore formed by flagellar protein FliP. *Molecular Microbiology* 107(1):94-103.
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet* 366(9491):1079-1084.
- Wheatley NM, Gidaniyan SD, Liu Y, Cascio D, Yeates TO (2013) Bacterial microcompartment shells of diverse functional types possess pentameric vertex proteins. *Protein Science* 22(5):660-665.
- Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, Cornely OA, Rahav G, Bouza E, Lee C (2017) Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine* 376(4):305-317.
- Woodley JF (1994) Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 11(2-3):61-95.
- Wu LJ, Feucht A, Errington J (1998) Prespore-specific gene expression in *Bacillus subtilis* driven by sequestration of SpoII E phosphatase to the prespore side of the asymmetric septum. *Genes & Development* 12(9):1371-1380.
- Yan T & Goldman RD (2020) Probiotics for antibiotic-associated diarrhea in children. *Canadian Family Physician* 66(1):37-39.
- Yang J & Yang H (2020) Transcriptome Analysis of the *Clostridioides difficile* Response to Different Doses of Bifidobacterium breve. *Frontiers in Microbiology* 11:1863.
- Yao F & Strauch MA (2005) Independent and interchangeable multimerization domains of the AbrB, Abh, and SpoVT global regulatory proteins. *Journal of Bacteriology* 187(18):6354-6362.
- Yuan P, Zhang H, Cai C, Zhu S, Zhou Y, Yang X, He R, Li C, Guo S, Li S (2015) Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell Research* 25(2):157-168.
- Yun B, Oh S, Griffiths M (2014) *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. *Journal of Dairy Science* 97(8):4745-4758.

- Zedtwitz-Liebenstein K, Wenisch C, Patruta S, Parschalk B, Daxböck F, Graninger W (2002) Omeprazole treatment diminishes intra- and extracellular neutrophil reactive oxygen production and bactericidal activity. *Critical Care Medicine* 30(5):1118-1122.
- Zhang F, Luo W, Shi Y, Fan Z, Ji G (2012) Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *The American Journal of Gastroenterology* 107(11):1755; p. 1755-1756.