



HAL
open science

Clostridium difficile: étude du processus de colonisation et d'hypervirulence de la souche épidémique 027

Amira Barketi Barketi-Klai

► To cite this version:

Amira Barketi Barketi-Klai. Clostridium difficile: étude du processus de colonisation et d'hypervirulence de la souche épidémique 027. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA114844 . tel-00922985

HAL Id: tel-00922985

<https://theses.hal.science/tel-00922985>

Submitted on 1 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : MICROBIOLOGIE / THERAPEUTIQUES ANTIINFECTIEUSES

DISCIPLINE : Microbiologie et thérapeutiques anti-infectieuses

ANNÉE 2012-2013

SÉRIE DOCTORAT N° 1197

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 12/10/2012

par

Amira BARKETI-KLAI

Clostridium difficile : étude du processus de colonisation et
d'hypervirulence de la souche épidémique 027

Directeur de thèse : Professeur Imad KANSAU Université Paris-Sud 11

Composition du jury :

<i>Rapporteurs :</i>	Professeur Marie José BUTEL	Université Paris-Descartes
	Docteur Pascale SERROR	INRA Jouy-en-Josas
<i>Examineurs :</i>	Professeur Anne COLLIGNON	Université Paris-Sud 11
	Docteur Bruno DUPUY	Institut Pasteur Paris
	Docteur Sarah KUEHNE	Université de Nottingham

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein de l'Unité EA4043 « Ecosystème microbien digestif et santé » à la faculté de pharmacie de Châtenay Malabry, Université Paris-Sud 11. Je tiens d'abord à remercier Professeur Anne Collignon de m'y avoir accueillie durant ces années et de m'avoir soutenue et aidée pour mon travail.

Merci vivement à l'ensemble des membres du jury : Pr. Marie José Butel, Pr. Anne Collignon, Dr. Pascale Serror, Dr Sahra Kuehne, Dr. Bruno Dupuy pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

J'ai bénéficié au cours de ces années de l'encadrement du Professeur Imad Kansau, un professeur pas comme les autres ! Un professeur talentueux, engagé et très généreux. Merci à toi Imad d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenue et de m'avoir surtout transmis le maximum de tes connaissances. Tu as su être un très bon encadrant pour moi tout au long de cette thèse, mais tu as surtout su être un grand frère pour moi. Saches que je porterai toujours ton amitié dans mon cœur, ainsi que celle de ta femme Anne et de ton adorable petite fille Aurence.

Un très grand merci à Thomas Candela que j'apprécie tout particulièrement. Merci Thomas pour ta disponibilité, ton implication et ta bonne humeur contagieuse.

Mes plus vifs remerciements également aux autres membres de l'équipe, à savoir Jean Christophe, Claire, Séverine, Sylvie, Alban et Thierry.

Une mention spéciale pour Sylvie Lambert-Bordes et pour Sandra Hoys, mes deux copines pour les manips *in vivo*. Franchement, un grand merci à toutes les deux. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite dans votre vie personnelle et professionnelle.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des thésards et des stagiaires que j'ai eu plaisir à côtoyer. Je pense plus particulièrement à Diana, Fariza et Véronique.

J'ai également eu la chance au cours de cette thèse de travailler avec plusieurs personnes :

Merci à Bruno Dupuy de m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'Institut Pasteur et de m'avoir aidée à réaliser une grande partie de ma thèse.

Merci à Marc Monot pour son humeur joyeuse, son implication, sa participation et son efficacité dans le travail sur les biopuces.

Merci à Soza Baban qui m'a permis de me réconcilier avec l'anglais et de bien avancer, toutes les deux, dans nos travaux de recherche.

Merci à Sahra Kuehne pour son aide et sa convivialité au cours des réunions dans le cadre du projet. Merci également à Nigel Minton pour son apport essentiel dans le projet Hyperdiff.

Merci à Claudine Deloménie pour sa grande disponibilité, son éternelle patience et ses précieux conseils pour réaliser les essais de RT-PCR en temps réel.

Merci également à Céline Boursier de toujours répondre présente en cas de besoin et pour sa bonne volonté et son implication dans mon projet même si notre travail n'a pas pu être poursuivi à cause d'une concurrence scientifique féroce.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai travaillé de près ou de loin et qui ont fait que ces années se soient aussi bien passées. Je garderai un très bon souvenir de vous tous et de ces années de thèse.

Je remercie du fond du cœur tous mes proches. En premier mes parents qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, qui m'ont apporté tout leur amour et leur soutien au cours de mes études et dans ma vie en général. Que Dieu vous préserve !

A mes deux sœurs chéries, Malek et Dalel, qui m'ont supportée depuis de longues années et auxquelles je dis merci et je vous aime.

A mes grands parents (paix à leurs âmes), oncles, tantes, cousins et cousines qui m'ont entourée et continuent à m'entourer au quotidien.

Enfin un énorme merci à Kais, véritable soleil (de la Tunisie!) de ma vie et père de mon chère fils Aziz, qui m'entoure de son amour, de son soutien et de sa patience tous les jours.

A ma famille et à mes deux hommes, je dédie cette thèse.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	6
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. Infections à <i>Clostridium difficile</i>	10
I.1. Généralités sur <i>Clostridium difficile</i>	10
I.2. Manifestations cliniques	10
I.2.1. Manifestations coliques	10
I.2.2. Manifestations extra-coliques	11
I.3. Facteurs de risque	12
I.3.1. Antibiotiques et autres médicaments.....	12
I.3.2. Facteurs liés à l'hôte	13
I.3.3. Facteurs liés à l'environnement.....	14
I.4. Diagnostic.....	14
I.5. Traitement	15
I.5.1. Antibiothérapie anti <i>C. difficile</i>	15
I.5.2. Traitement des rechutes.....	16
I.5.3. Traitements en développement	16
I.6. Changements épidémiologiques récents.....	18
I.6.1. Emergence de souches épidémiques et à virulence accrue	18
I.6.2. Apparition de nouvelles populations à risque	19
I.6.3. Contamination animale et végétale.....	20
II. Facteurs de virulence de <i>C. difficile</i>	22
II.1. Les facteurs de colonisation.....	22
II.1.1. Les adhésines	22
II.1.2. Les enzymes à activité protéolytique.....	29
II.1.3. Les protéines flagellaires.....	31
II.1.4. Autres protéines à propriétés adhésives potentielles	33
II.2. Les toxines.....	33
II.2.1. Les toxines TcdA et TcdB.....	33

II.2.2. La toxine binaire.....	41
II.3. Autres facteurs de « virulence »	43
II.3.1. La spore	43
II.3.2. La tolérance au <i>p-cresol</i>	44
II.3.3. La résistance aux peptides antimicrobiens.....	44
II.3.4. Srl : un nouveau facteur de virulence	46
III. Spécificités des souches dites « hypervirulentes ».....	47
III.1. Souche épidémique NAP1/BI/027	47
III.1.1. Historique.....	47
III.1.2. Evolution phylogénétique	48
III.1.3. Spécificités génétiques des souches 027	48
III.1.4. Particularité des toxines chez les souches 027	51
III.1.5. Importance de la sporulation chez les souches 027	52
III.1.6. Autres particularités des souches 027	53
III.2. Autres souches émergentes.....	54
TRAVAUX PERSONNELS.....	56
OBJECTIFS SCIENTIFIQUES	57
I. Rôle de la protéine de liaison à la fibronectine, FbpA, dans le processus de colonisation de <i>C. difficile</i>	59
I.1. Introduction	59
I.2. Article 1	60
II. Rôle des protéines flagellaires dans la colonisation de <i>C. difficile</i>	71
II.1. Phénotype des mutants flagellaires dans l'adhésion <i>in vitro</i> et la colonisation <i>in vivo</i>	71
II.1.1. Introduction	71
II.1.2. Article 2	72
II.2. Rôle de la flagelline, FliC, dans le processus de colonisation <i>in vivo</i>	109
II.2.1. Introduction	109
II.2.2. Matériels et méthodes.....	110
II.2.3. Résultats et discussion	118
II.2.4. Conclusion	135
III. Etude de la cinétique de colonisation <i>in vivo</i> de <i>C. difficile</i> 027 par analyse transcriptomique	139
III.1. Introduction	139

III.2. Matériels et méthodes.....	139
III.3. Résultats et discussion	140
III.3.1. Gènes du métabolisme et de transport membranaire	141
III.3.2. Expression <i>in vivo</i> des gènes régulateurs	141
III.3.3. Expression <i>in vivo</i> des gènes des facteurs de virulence.....	142
III.3.4. Expression <i>in vivo</i> de gènes spécifiques aux souches 027 et à la souche R20291.....	145
III.4. Conclusion	146
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	147
CONCLUSION.....	155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	158
ANNEXE.....	183

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ICD	Infections à <i>Clostridium difficile</i>
CPM	Colites Pseudo-Membraneuses
IPP	Inhibiteurs de Pompes à Protons
ADN	Acide DésoxyriboNucléotidique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	AND génomique
ARN	Acide RiboNucléotidique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
ADP	Adenosine Di-Phosphate
agr	accessory gene regulator
pb	paire de base
kDa	kilo Dalton
PCR	Polymerase Chain Reaction
UFC	Unité Formant Colonie
Cwp	Cell Wall Protein
Fbp	Fibronectin Binding Protein
SLP	Surface Layer Protein
ORF	Open Reading Frame (= cadre ouvert de lecture)
NAP1	North American pulsotype 1
PTS	phospho-transferase system

RIN	RNA integrity number
PBS	Phosphate Buffer Saline
IL	Interleukine
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ECF	Extra-Cytoplasmic Function
CcpA	Catabolite control protein A
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
HK	Histidine Kinase
RR	Régulateur de Réponse cytoplasmique
Opp	Oligo-Peptide Permeases
TA	Système Toxine-Antitoxine
Cy3/Cy5	Cyanine 3 et Cyanine 5
PR	PCR-ribotype

INTRODUCTION

Clostridium difficile, bacille à Gram positif anaérobie sporulé, est responsable de 15 à 25 % des cas de diarrhées post-antibiotiques et de plus de 95 % des cas de colites pseudomembraneuses acquises le plus souvent en milieu hospitalier. Cependant l'existence de formes communautaires d'infections à *C. difficile* (ICD) a été aussi largement démontrée. Une des particularités des ICD est la tendance aux rechutes observées chez certains patients faisant de ces infections un problème de santé assez préoccupant. Depuis le début des années 2000, les ICD ont pris une autre dimension surtout avec l'apparition de nouvelles souches plus virulentes. Ces souches de type 027/NAPI/BI ont été associées à des épidémies de diarrhées sévères avec de forts taux de mortalité. Les premières épidémies ont été décrites au Canada et aux Etats-Unis, mais ce phénomène a rapidement rejoint l'Europe surtout le Royaume Uni, les Pays Bas mais aussi la France.

Les ICD surviennent le plus souvent après une antibiothérapie qui participe à la rupture du microbiote de barrière et permet ainsi l'implantation de *C. difficile* au niveau du tractus gastro-intestinal. Cette colonisation du tube digestif de l'hôte par *C. difficile* met en jeu différentes adhésines (Cwp66, GroEL, Fbp66, protéines de la couche S), des protéines flagellaires (FliC et FliD) ainsi que des enzymes hydrolytiques et protéolytiques (Cwp84 et Cwp13). Une fois implantées, les souches toxigènes de *C. difficile* sécrètent principalement deux toxines, TcdA et TcdB, capables de détruire les entérocytes par dépolymérisation des filaments d'actine du cytosquelette. Elles induisent également une réaction inflammatoire intense avec recrutement de polynucléaires au niveau de la lamina propria. Les souches de type 027/NAPI/BI sont aussi capables de produire une autre toxine dite « toxine binaire » qui a été associée à plusieurs reprises à des infections sévères voire mortelles. Le rôle de cette toxine n'a cependant pas été clairement établi et sa présence seule n'explique pas l'hypervirulence de ces souches. Un certain nombre d'études réalisées sur ce type de souches ont été consacrées à la problématique de leur hypervirulence sans grand succès. Les résultats rapportés jusque-là concernant les caractéristiques génétiques de ces souches, leur capacité de production de toxines ainsi que leur capacité à produire des spores sont assez contradictoires. Nous nous sommes donc intéressés à ces souches et plus particulièrement à leur processus de colonisation étant donné que cette étape est un pré-requis indispensable pour l'établissement de l'infection à *C. difficile*.

Dans ce manuscrit, nous allons tout d'abord présenter une revue bibliographique sur les infections à *C. difficile*, sa pathologie et ses facteurs de virulence, les données actuellement connues sur les souches 027/NAPI/BI ainsi que d'autres souches émergentes au caractère virulent. Nous développerons ensuite nos travaux expérimentaux qui ont consisté à étudier certaines protéines de surface à propriétés adhésives chez la souche non épidémique de PCR-ribotype 012 (630) et la souche épidémique de PCR-ribotype 027 isolée lors de l'épidémie de Stoke Mandeville en Angleterre (souche R20291) et à étudier la cinétique de colonisation de la souche R20291 pendant le processus d'infection *in vivo*.

Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à la protéine de liaison à la fibronectine FbpA et à son rôle dans le processus d'adhésion et de colonisation de *C. difficile*. Dans un second temps, nous nous sommes penchés sur l'étude de protéines flagellaires (dont la flagelline FliC) et leurs rôles dans les processus de colonisation et de virulence de *C. difficile*. Finalement, nous avons étudié, par analyse transcriptomique, la cinétique de colonisation de la souche 027 R20291 dans un modèle de souris monoxéniques.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Infections à *Clostridium difficile*

I.1. Généralités sur *Clostridium difficile*

Clostridium difficile est un bacille à Gram positif, anaérobie, sporulé, qui a été identifié chez des nouveau-nés par Hall et O'Toole en 1935 [1]. Ils l'ont au début surnommé « *Bacillus difficilis* » à cause des difficultés rencontrées pour son isolement et pour sa culture *in vitro*. Initialement, cette bactérie a été considérée comme un commensal de l'homme, et ce jusqu'aux années 70, plus précisément en 1978, année où Bartlett et coll. ont établi un lien entre cette bactérie et les colites pseudomembraneuses (CPM) [2]. Depuis, il est établi que *C. difficile* est le principal entéropathogène impliqué dans les diarrhées nosocomiales bactériennes chez l'adulte. Il est également responsable de 15 à 25 % des diarrhées post-antibiotiques et de plus de 95 % des cas de colites pseudomembraneuses [3-5].

Le processus infectieux de *C. difficile* se résume en deux grandes étapes. La première étape étant la colonisation du tube digestif de l'hôte par les spores d'origine endogène ou exogène. De façon générale, cette étape de colonisation est rendue possible grâce à la perturbation du microbiote intestinal de barrière suite à un traitement antibiotique. Cette étape fait intervenir différents facteurs de colonisation dont des adhésines et probablement des enzymes hydrolytiques et protéolytiques. La seconde étape repose ensuite sur la production, par des souches toxigènes de *C. difficile*, de deux toxines TcdA et TcdB qui sont responsables des lésions intestinales [6]. Certaines souches de *C. difficile* synthétisent, en plus, un autre type de toxine, la toxine CDT, appelée couramment toxine binaire. Son rôle dans la virulence est cependant non encore élucidé.

I.2. Manifestations cliniques

I.2.1. Manifestations coliques

La colonisation par *C. difficile* peut être asymptomatique ou symptomatique. Environ 3 % des adultes sains et 5 à 70 % des nouveau-nés sont porteurs asymptomatiques de *C. difficile* dont moins de 1 % pour les adultes et 5 à 63 % pour les nouveau-nés sont porteurs de souches

toxinogènes [7, 8].

Les formes cliniques des ICD sont variées. Elles vont d'une simple diarrhée à la colite pseudomembraneuse parfois mortelle. L'infection peut alors se manifester sous forme de diarrhées plutôt modérées au cours du traitement antibiotique ou longtemps après son arrêt, parfois plusieurs mois. L'infection peut également se manifester sous forme de colite ou de colite pseudomembraneuse qui 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 infections digestives à *C. difficile* [7]. On parle également de colite fulminante, dans le cas de complications sévères pouvant engendrer des perforations coliques, un mégacôlon ou encore un iléus, qui nécessitent tous une intervention chirurgicale urgente [9,10]. Les infections par *C. difficile* sont mortelles dans 5,99 % des cas avec une nette augmentation significative depuis l'an 2000 [11].

Un des aspects caractéristiques de ces infections est le taux élevé de récurrences. Quinze à 25 % des patients traités rechutent après un traitement efficace de l'infection [5]. Ces récurrences se manifestent par une soudaine réapparition de la diarrhée et autres symptômes, après un traitement à la vancomycine ou au métronidazole [9]. Un patient qui présente une première récurrence a davantage de risque de faire des récurrences ultérieures. Ces récurrences ne sont apparemment pas dues à une résistance de *C. difficile* aux antibiotiques, mais seraient plutôt dues à une rechute par la même souche, probablement via la persistance des spores, ou à une réinfection par une autre souche exogène [12]. D'ailleurs, 48,4 % des récurrences surviennent suite à une réinfection par une souche différente de *C. difficile* [13].

1.2.2. Manifestations extra-coliques

Les infections à *C. difficile* ne se limitent pas au côlon et quelques cas rares de manifestations extra-coliques ont été décrits. Ces cas sont généralement suite à une colite à *C. difficile* ou à une rupture anatomique ou chirurgicale du côlon et ce même en l'absence de traitement antibiotique préalable [14]. *C. difficile* peut, en effet, infecter entre autres, l'intestin grêle avec formation de pseudomembranes dans le mucus iléal. Le taux de mortalité associé à ce

type d'infection est assez élevé, avec 4 décès parmi les 7 patients rapportés [14]. *C. difficile* peut également provoquer des arthrites réactionnelles qui touchent en général les articulations des membres inférieurs. Mais seulement une quarantaine de cas ont été décrits à ce jour [15, 16]. *C. difficile* est aussi à l'origine de bactériémies avec, dans la plupart des cas, des pathologies gastro-intestinales sous-jacentes. Quinze cas de bactériémie à *C. difficile* ont été rapportés dont la moitié des cas sont décédés au courant de la semaine suivant l'infection [17]. D'autres types d'infections imputés à *C. difficile* ont été décrits dans la littérature comme des ostéomyélites, des abcès viscéraux ou intra-abdominaux, des empyèmes, des cellulites ou des fasciites nécrosantes ; mais ces cas sont exceptionnels [9, 14].

I.3. Facteurs de risque

Les facteurs de risque d'infections à *C. difficile* sont nombreux. De façon générale, ce sont des facteurs en relation avec la prise de médicaments et plus particulièrement d'antibiotiques, et/ou des facteurs liés à l'hôte et à son environnement.

I.3.1. Antibiotiques et autres médicaments

Les infections à *C. difficile* sont des infections nosocomiales qui surviennent, en général, après un traitement antibiotique. Le microbiote digestif de barrière serait rompu sous l'action des antimicrobiens, ce qui favoriserait l'implantation et la prolifération de *C. difficile*. En cas de colonisation par une souche toxigène, la production de toxines est à l'origine des lésions associées.

Les traitements antibiotiques constituent un risque majeur d'ICD. Dans les années 70, la clindamycine représentait le plus haut facteur de risque pour les infections à *C. difficile* ; mais la diminution de la fréquence de son utilisation par la suite a permis de minimiser les risques d'infections qui lui étaient associés. Puis à la fin des années 80 et au début des années 90, les bêta-lactamines et les céphalosporines surtout celles de la 3^{ème} génération sont devenues les antibiotiques les plus à risque. Plus récemment, ce sont les fluoroquinolones à large spectre qui ont été associées aux risques d'infection à *C. difficile*. De manière générale, presque tous les

antibiotiques peuvent induire des infections à *C. difficile*, même la vancomycine et le métronidazole qui sont les deux antibiotiques de choix pour le traitement des ICD [18, 19]. La durée du traitement antibiotique, ainsi que l'association de différents antibiotiques, semblent toutefois jouer un rôle important [8].

Le risque d'infection à *C. difficile* est également accentué par un traitement aux anti-acides, plus particulièrement les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) [20, 21]. Ce risque est évalué à 2,5 fois plus chez des patients traités par des IPP que chez des patients non traités. 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 [22]. De la même façon, Dial et coll. ont également démontré une augmentation du risque d'infection à *C. difficile* suite à la prise d'IPP (2,9 fois plus d'infections) et suite à la prise d'antihistaminiques H2 (2,1 fois plus d'infections). Ils rapportent, de plus, un taux non négligeable d'infections liées à la prise de médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens [23]. Andrés et coll. ont décrit un cas de colite à *C. difficile* associée à un traitement par un antiherpétique, le valacyclovir [24].

1.3.2. Facteurs liés à l'hôte

Les personnes âgées, surtout de plus de 65 ans, sont considérées comme une population à risque d'infections à *C. difficile*. Cette prédisposition pourrait être due à la diminution de la réponse immunitaire, à des pathologies sous-jacentes plus sévères, des traitements antibiotiques fréquents, des hospitalisations fréquentes ou encore à la modification de l'écosystème digestif. La mortalité liée à l'infection par *C. difficile* est dépendante de l'âge. En effet, des patients 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 [11]. Ces taux peuvent être plus ou moins biaisés par le risque de mort naturelle vu l'âge avancé de ces personnes, mais ils reflètent néanmoins une importante augmentation du risque lié à l'infection à *C. difficile*.

D'autres facteurs de risque d'ICD liés à l'hôte ont été également décrits comme la gravité de la pathologie sous-jacente [7, 25], les antécédents de chirurgie digestive ou de maladies inflammatoires intestinales [25, 26], les transplantations [27-29] et la chimiothérapie [30, 31].

I.3.3. Facteurs liés à l'environnement

L'acquisition de *C. difficile* est favorisée par la promiscuité avec des patients porteurs ou par contact avec le personnel soignant ou l'environnement hospitalier. Des hospitalisations prolongées ou répétées, l'admission dans certains services hospitaliers ou les soins intensifs sont autant de facteurs qui peuvent augmenter le risque d'infection [3, 32]. Cela est probablement dû à la dissémination et la persistance des spores de *C. difficile*, en plus de la fragilité des personnes hospitalisées et le recours fréquent aux antibiotiques. L'hygiène des mains, des locaux et du matériel est alors sans doute le meilleur moyen pour prévenir les infections à *C. difficile*.

I.4. Diagnostic

Le diagnostic des pathologies associées aux infections à *C. difficile* repose soit sur la mise en évidence des toxines dans les selles diarrhéiques, soit sur l'isolement d'une souche toxigène [33].

L'une des méthodes de référence pour la mise en évidence des toxines est la détection de la cytotoxicité des selles. Ce test consiste à étudier l'effet cytopathogène d'un filtrat de selles sur des cultures cellulaires. C'est, malheureusement, une méthode longue (24-48 h) et nécessitant une infrastructure adaptée. Cette méthode est néanmoins plus spécifique et plus sensible que les tests immuno-enzymatiques qui permettent de détecter la toxine TcdA ou les toxines TcdA et TcdB simultanément. Il est toutefois recommandé de privilégier la mise en évidence des deux toxines en raison de l'émergence de souches qui ne produisent que la toxine B. Malgré la rapidité des tests immuno-enzymatiques, leur sensibilité est faible (70-80 %) [34].

La culture toxigénique qui associe culture et détection de toxines par la souche isolée est aussi une méthode de référence, mais elle est longue et peu spécifique (dépistage possible de porteurs asymptomatiques). Cependant, elle permet l'isolement de la souche et ultérieurement son typage moléculaire [33, 34]. D'autres techniques ont été également développées comme les tests immuno-enzymatiques permettant la mise en évidence, dans les selles, d'une enzyme spécifique de *C. difficile*, la glutamate déhydrogénase ou GDH. Ce type de test est assez sensible mais ne permet pas de prédire le caractère toxigène de la souche. C'est un bon test de dépistage ayant

une excellente valeur prédictive négative [35]. Des techniques faisant appel à la PCR en temps réel se développent actuellement. Elles sont une alternative intéressante par leur rapidité et leur excellente sensibilité [36].

I.5. Traitement

I.5.1. Antibiothérapie anti *C. difficile*

L'arrêt du traitement antibiotique ou sa substitution par un autre antibiotique à moindre risque sont les premières mesures à mettre en place en cas d'infection à *C. difficile*. Il est, en revanche, recommandé de prescrire du métronidazole ou de la vancomycine si les symptômes cliniques persistent ou si l'antibiotique responsable ne peut être arrêté ou modifié. Le métronidazole est le plus souvent favorisé, en milieu hospitalier, à cause de son faible coût et du fait de l'absence de risque de sélection d'entérocoques résistants à la vancomycine. En revanche, la vancomycine *per os* est le traitement le mieux adapté et le plus efficace en cas d'ICD graves [37]. Ces deux antibiotiques présentent, toutefois, deux problèmes majeurs : l'absence de réponse en cas de complications cliniques (ileus ou mégacôlon toxique) et le risque de rechutes après arrêt de l'antibiothérapie. Ces dernières années, le taux d'échec des traitements par métronidazole est en nette augmentation surtout avec l'émergence de la souche hypervirulente NAP1/B1/027 (NAP1 en référence au profil en électrophorèse en champ pulsé, BI en référence au profil après restriction enzymatique et 027 pour le PCR-ribotype) [10]. D'autres antibiotiques (rifampicine, bacitracine, rifaximine, nitazoxanide et acide fusidique) ont été testés pour le traitement des ICD et semblent avoir plus ou moins la même efficacité que le métronidazole et la vancomycine [38]. La tigécycline et surtout la fidaxomicine (également connu sous les noms OPT-80, ou PAR-101 ou tiacumicine B) ont également donné des résultats prometteurs, surtout dans le traitement des ICD réfractaires [39-41]. Les intérêts de la fidaxomicine sont sa spécificité sur les bactéries à Gram positif tout en préservant l'activité barrière du microbiote intestinal, sa forte concentration dans les selles après administration orale (non absorption) et son action régulatrice négative sur la sporulation et la production des toxines [42, 43].

Les possibilités de traitement des ICD, proposées par l'Institut National d'Excellence en Santé et en Services Sociaux du Québec (INESSS) sont résumées dans la figure 1 (www.cdm.gouv.qc.ca).

I.5.2. Traitement des rechutes

Les cas de récurrences sont les cas les plus difficiles à traiter et il n'existe, actuellement, aucun consensus les concernant. En général, le métronidazole est re-prescrit en cas de première rechute, à moins que le patient souffre d'infection sévère. La vancomycine est alors prescrite ou re-prescrite à des doses variables pendant environ six semaines [44, 45]. D'autres traitements ont été également testés avec plus ou moins de succès tels la rifaximine prescrite suite à un traitement à la vancomycine ou l'emploi de la fidaxomicine [46]. L'association de probiotiques (principalement *Saccharomyces boulardii*) aux antibiotiques a été également testée [47, 48]. Le recours aux probiotiques reste, cependant, une approche discutée. Pillai et Nelson ont d'ailleurs réalisé une méta-analyse des études effectuées entre 1966 et 2007 pour l'évaluation de l'effet thérapeutique des probiotiques sur les ICD. Ils ont alors retenu quatre études dont une seule montrant un effet bénéfique de l'utilisation combinée des probiotiques avec les antibiotiques [49]. Enfin, une approche intéressante est la reconstitution du microbiote de barrière par la transplantation fécale [50, 51].

Les moyens de traitement des rechutes des ICD sont résumés dans la figure 2 (www.cdm.gouv.qc.ca).

I.5.3. Traitements en développement

▪ Immunisation passive

D'autres stratégies de traitement des ICD sont à l'étude. Parmi les options envisagées, l'utilisation des immunoglobulines intraveineuses apparaît comme une alternative intéressante pour le traitement des ICD, notamment celles qui sont sévères et récidivantes. Leur mécanisme d'action consiste à neutraliser, principalement, la toxine TcdA par des anticorps IgG anti-toxine. Leur efficacité a été prouvée dans des modèles animaux, mais très peu d'études ont été réalisées

chez l'homme. Elles devraient donc être utilisées seulement en tant qu'adjuvants thérapeutiques en attendant d'avoir des études plus complètes [52, 53].

Une approche immunologique avec administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre les toxines TcdA et TcdB pourrait se révéler intéressante [54]. Les essais sont actuellement en phase II ou III.

- **Immunisation active**

Des essais de vaccination contre *C. difficile* sont également en cours de développement. La plupart des essais réalisés sont fondés sur le pouvoir immunogène des toxines TcdA et/ou TcdB. Pour cela, différents essais utilisant des toxines ou une partie de toxines inactivées ont été testés chez l'animal, puis chez l'homme (essai phase I). Différentes voies d'administration ont également été étudiées. Les résultats découlant de ces essais sont plutôt encourageants et montrent, pour la plupart, l'acquisition d'une protection contre les infections à *C. difficile* et l'absence de risque pour l'homme [55-62]. Des essais de phase II et III sont en cours.

- **Autres essais d'immunisations**

Une autre alternative intéressante serait l'utilisation de protéines de surface comme immunogènes. Il a été en effet démontré que les protéines Cwp84, FliD et FliC pourraient être de bons candidats vaccinaux, en raison de leur faible variabilité, de leur immunogénicité et de leur pouvoir à réduire le taux de colonisation de *C. difficile* chez la souris [63-65]. Des essais récents d'immunisation par la Cystéine protéase Cwp84 ont aussi montré des résultats satisfaisants. En effet, 26 % des hamsters immunisés par Cwp84 par voie rectale sont moins colonisés par *C. difficile* et 33 % d'entre eux survivent plus longtemps que les hamsters non immunisés [66]. La protéine Cwp84, encapsulée dans des billes de pectines et donnée aux hamsters par voie orale, permet également une meilleure protection des hamsters [67].

Une étude protéomique des sérums de six patients infectés par *C. difficile* a révélé une forte réaction immunitaire contre la protéine de surface SLP (*Surface Layer Protein*) [68]. Des essais d'immunisation passive et active avec la protéine SLP montrent cependant peu de réponse protectrice dans le modèle hamster [69, 70].

I.6. Changements épidémiologiques récents

C. difficile est l'un des germes les plus souvent en cause dans les infections nosocomiales digestives, en particulier chez les personnes âgées. L'infection à *C. difficile* se manifeste en général suite à un traitement antibiotique qui va provoquer la rupture du microbiote de barrière et faciliter l'implantation de la bactérie. La contamination se fait par voie oro-fécale à partir de spores transmises de malade à malade, par l'intermédiaire du personnel soignant ou par l'environnement. Des données épidémiologiques récentes révèlent toutefois une augmentation d'infections communautaires à *C. difficile*, dont certaines ne font pas suite à une prise d'antibiotiques. L'une des souches fréquemment retrouvées en communauté est la souche de PCR-ribotype (PR) 078 [71]. De plus, des cas d'ICD sont nouvellement décrits chez des populations considérées jusque là à faibles risques [72]. *C. difficile* est aussi retrouvé chez plusieurs espèces animales et dans différents types d'aliments carnés. Les animaux d'élevage sont d'ailleurs suspectés d'être une source d'infection pour l'homme vu la similarité retrouvée entre les souches animales et les souches humaines [73].

I.6.1. Emergence de souches épidémiques et à virulence accrue

Depuis le début des années 2000, l'incidence et la sévérité des infections liées à *C. difficile* ont nettement augmenté. Ces infections sont en effet caractérisées par une morbidité et une mortalité plus importantes [74, 75]. Une moins bonne réponse au traitement par métronidazole a été également observée, avec un nombre d'échecs thérapeutiques plus important et un risque de rechutes accru [76, 77, 78, 79]. L'augmentation du nombre d'admissions de patients infectés par *C. difficile*, ainsi que l'allongement du temps de séjour et les hospitalisations répétées suite à des récives ont fait des ICD un problème sanitaire et économique majeur. Bien que jugés sous-estimés, les coûts associés aux ICD ont été évalués entre 1,3 milliard de dollars et 3,4 milliards de dollars par an, avec une nette augmentation de coût évaluée entre 33 % et 54 % [80-82]. Parmi les raisons expliquant une telle incidence et une telle gravité, il y a l'émergence de souches plus virulentes et plus particulièrement les souches de PR 027. Ces souches ont été responsables de plusieurs épidémies partout dans le monde plus particulièrement en Amérique puis en Europe [83, 84, 85]. En Amérique du Nord, ces souches ont été associées à une incidence

5 fois plus élevée, à des infections plus sévères (18,2 % de complications vs 7,1 %), des taux de rechutes plus importants (47,2 % vs 20,8 %), des taux de mortalité accrus (13,8 % vs 4,7 %) et à une plus grande résistance aux fluoroquinolones [86]. Des taux de mortalité encore plus élevés (16,7 %) ont été également rapportés [83].

I.6.2. Apparition de nouvelles populations à risque

Bien que les infections à *C. difficile* soient connues comme nosocomiales, plusieurs cas d'ICD ont été décrits dans la communauté. Le taux d'infections communautaires rapportées varie entre 7,6 et 25 cas pour 100 000 habitants, selon les études [87-89]. La plupart de ces études démontrent un lien entre la maladie et l'exposition aux antibiotiques. Mais, récemment, de nouveaux cas d'ICD d'origine communautaire sont rapportés chez des sujets sains n'ayant pas été hospitalisés et n'ayant pas reçu d'antibiotiques au préalable. D'après Wilcox et coll., un tiers des personnes diarrhéiques et détectées positives à la toxine B de *C. difficile* n'ont pas été hospitalisées pendant les six derniers mois et n'ont pas été traitées aux antibiotiques lors du mois précédant l'apparition de la diarrhée [90]. Parmi tous les cas d'ICD étudiés au Royaume Uni, *C. difficile* de PR 001 est à l'origine de 60 % des cas acquis en milieu urbain et 13 % des cas acquis en milieu semi-rural [90].

Ces dernières années, une autre population a vu également le risque d'infection par *C. difficile* se multiplier pratiquement par 2. Il s'agit des femmes enceintes en *peri-partum* [91]. Une étude réalisée en 2003-2007 aux Etats-Unis révèle un taux de 0,7 cas d'ICD pour 1 000 admissions [92]. Une épidémie a été d'ailleurs rapportée entre Avril 2006 et Juin 2007, dans le service obstétrical du centre médical de Washington avec 20 cas d'ICD (7,5 cas d'ICD pour 1000 accouchements). Ces ICD en *peri-partum* seraient principalement associées à l'accouchement par césarienne (70 %) et à la prise d'antibiotiques (95 %) [93].

Des cas d'infections à *C. difficile* sont également diagnostiqués dans les services pédiatriques. Bien que la colonisation par *C. difficile* soit le plus souvent asymptomatique pour les enfants de moins de 2 ans [94], de plus en plus de cas d'ICD se manifestent chez le jeune enfant. L'étude la plus récente montre qu'aux Etats-Unis, le taux d'hospitalisations d'enfants liées aux ICD a augmenté de 7,24 à 12,8 pour 10 000 hospitalisations, entre 1997 et 2006. Les

enfants de moins de 1 an seraient les moins touchés (32,01), plus particulièrement les nouveau-nés (0,5) contrairement aux enfants de 1-4 ans (44,87) et aux enfants de 5-9 ans (35,27) [95]. Une autre étude de Toltzis et coll. montre que 19,4 % des enfants hospitalisés seraient porteurs de la souche NAP1/027 [96].

I.6.3. Contamination animale et végétale

Depuis quelques années, *C. difficile* a été identifié en tant que pathogène des animaux, principalement des chevaux, porcelets, bovins et des animaux domestiques [97-99]. Très peu de données sont disponibles sur l'épidémiologie et le génotypage de *C. difficile* chez les animaux. Quelques études suggèrent, néanmoins, une faible diversité génotypique par rapport aux souches isolées chez l'homme [100, 101]. La plupart des souches identifiées sont différentes de celles identifiées chez l'homme, sauf quelques unes retrouvées dans les deux espèces. Cela suggère fortement la possibilité de transmission de *C. difficile* des animaux à l'homme. Parmi ces souches, la souche de PR 078 a été identifiée comme souche dominante chez le porc (83 %) et le veau (94 %) [101]. Deux autres souches épidémiques, les souches 027 et 017, ont été également retrouvées chez des veaux au Canada [102].

En 1996, *C. difficile* a été identifié, pour la première fois, dans des produits carnés en emballage sous-vide [103]. Depuis, *C. difficile* a été retrouvé, à plusieurs reprises, dans les aliments pour animaux et ceux destinés à la consommation humaine. Les spores de *C. difficile* ont été, en effet, identifiés dans la viande crue pour chiens [104], dans la viande de bovins, de porcs et de volaille vendue au détail [105-110], ainsi que dans les fruits de mer et les poissons [111]. D'après ces études, le taux de contamination par *C. difficile* varie entre 1,8 % et 42 %. Les souches identifiées sont, dans la plupart des cas, des souches toxigènes dont certaines sont indistinguables des souches pathogènes humaines connues. Par ailleurs, toujours d'après les mêmes sources, des souches de PR 078/toxinotype V et des souches de PR 027/toxinotype III ont été majoritairement identifiées parmi les différents échantillons étudiés.

En France, *C. difficile* n'a été détecté que dans la viande hachée emballée sous-vide. Le taux de détection est en revanche très faible par rapport aux taux rapportés dans d'autres pays. Seulement deux souches de PR 012 ont été identifiées [112].

La contamination par *C. difficile* a été également rapportée dans les végétaux [113, 114]. La première étude a été réalisée au pays de Galles du Sud où *C. difficile* a été retrouvé dans 2,4 % des végétaux étudiés (2 pommes de terre, 1 oignon, 1 radis, 1 carotte, 1 concombre et 1 champignon) avec 71 % d'isolats toxigènes [113]. La deuxième étude a été réalisée en Ecosse avec l'identification de *C. difficile* dans des salades prêtes à l'emploi. Deux des trois isolats identifiés appartiennent au PR 017 et le troisième est de PR 001, deux souches déjà impliquées dans des maladies humaines [114].

II. Facteurs de virulence de *C. difficile*

La pathogénèse des infections à *C. difficile* se déroule en deux grandes étapes. La première étape constitue la phase de colonisation intestinale au cours de laquelle la bactérie s'implante et se multiplie dans le tractus digestif de l'hôte. La seconde étape repose sur la production par les souches toxigènes de *C. difficile* des toxines TcdA et TcdB qui seront à l'origine des lésions intestinales.

Les différentes étapes de cette pathogénèse sont décrites dans la figure 3.

II.1. Les facteurs de colonisation

L'étape de colonisation du tractus digestif par *C. difficile* est une étape cruciale. Elle permet à *C. difficile* de persister dans le tractus gastro-intestinal, continuellement lavé par des fluides intestinaux, et lui permet d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales. Cette étape fait intervenir différentes protéines de surface dont la plupart ont été identifiées dans notre laboratoire.

II.1.1. Les adhésines

II.1.1.1. Protéines de la « couche S »

De nombreuses bactéries possèdent à leur surface une couche cristalline en deux dimensions appelée « couche S » (*S-layer*), composée de protéines ou de glycoprotéines couvrant entièrement la cellule. Outre son rôle en tant que tamis moléculaire, la couche S joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et dans la protection contre les macrophages et contre certains bactériophages. Toutes les souches de *C. difficile* présentent, à leur surface, une couche S composée de deux couches protéiques superposées. La couche la plus externe est constituée d'une protéine de faible poids moléculaire, dite LMW-SLP (*Low Molecular Weight - Surface Layer Protein*) et la couche interne est constituée d'une protéine glycosylée de haut poids moléculaire, HMW-SLP (*High Molecular Weight - Surface Layer Protein*) (figure 4) [115, 116]. Les deux protéines dérivent d'un précurseur commun SlpA après la libération du peptide signal

et après un deuxième clivage de la protéine SlpA par la protéase Cwp84 (au niveau de la sérine 321) permettant la libération des deux formes matures de SLPs (LMW-SLP et HMW-SLP) (figure 5) [117, 118, 119]. La protéine LMW-SLP, de taille comprise entre 32 et 38 kDa, correspond à la partie N-terminale du précurseur. Elle est très variable et immunodominante. Il existe toutefois un motif hautement conservé au niveau de son extrémité C-terminale. La protéine HMW-SLP (42-48 kDa) quant à elle correspond à la partie C-terminale du précurseur SlpA et elle est relativement conservée entre les souches. La région du site de clivage protéolytique est également hautement conservée [118, 120]. Après clivage de la protéine SlpA, les deux sous-unités LMW-SLP et HMW-SLP se réassocient, de façon non covalente, pour former un complexe (*L/H complex*) à la surface bactérienne. Le type d'ancrage de ce complexe à la surface bactérienne n'est pas connu à ce jour. L'interaction entre les deux sous-unités se fait au niveau des résidus 260-321 de la partie C-terminale de LMW-SLP et des résidus 1-40 de la région N-terminale de HMW-SLP [116].

Le précurseur SlpA est codé par le gène *slpA* qui est situé dans un cluster de gènes de 37 kb portant 17 cadres ouverts de lecture (ORF) orientés dans le même sens (figure 6). Ce cluster comprend entre autres les gènes codant la protéine d'adhésion Cwp66, l'enzyme protéolytique Cwp84 et une protéine sécrétoire SecA2 qui pourraient être impliquée dans l'export des deux sous-unités SLPs au travers de la membrane bactérienne. Onze de ces ORFs dont *slpA*, *cwp66* et *cwp84* présentent un peptide signal, un domaine fonctionnel variable et un domaine C- ou N-terminal montrant des homologues de séquence avec le domaine d'ancrage de l'autolysine CwlB de *Bacillus subtilis* (figure 6) [121]. Le gène *slpA* est fortement co-transcrit tout au long de la phase de croissance avec le gène *orf6* situé en amont [122].

Les protéines SLPs purifiées montrent une forte capacité de liaison aux cellules épithéliales humaines et aux tissus gastro-intestinaux murins. Cette liaison est exclusivement associée à la sous-unité HMW-SLP. De plus, des anticorps dirigés contre les protéines HMW-SLPs bloquent partiellement l'adhésion de *C. difficile* aux cellules HEp-2. HMW-SLPs sont également capables de se lier et d'interagir avec la matrice extracellulaire et plus particulièrement avec le collagène I, la thrombospondine et la vitronectine [123]. Les protéines SLPs permettraient ainsi la colonisation de l'épithélium par *C. difficile* en facilitant l'accès des toxines aux entérocytes et en empêchant leur éventuelle dégradation par les enzymes protéolytiques digestives. Elles

contribueraient également, grâce à leurs interactions avec certains composants de la matrice extracellulaire, à renforcer les dommages tissulaires en bloquant ou en inhibant leurs fonctions respectives. En effet, le collagène joue un rôle structural important, la thrombospondine permet l'assemblage de complexes multi-protéiques impliqués dans l'adhésion ou la signalisation cellulaire et la vitronectine intervient dans le contrôle de l'intégrité de la matrice extracellulaire. Les protéines HMW-SLPs pourraient également, grâce à leurs liaisons à ces composants de la matrice, masquer certains déterminants antigéniques et échapper par conséquent à la réponse immunitaire [123].

Les protéines SLPs contribueraient également à la pathogénie de *C. difficile* en perturbant l'équilibre entre cytokines régulatrices et cytokines pro-inflammatoires. Elles induiraient, en effet, une surproduction d'interleukines IL6 et IL1 β par les monocytes, une prolifération des cellules T, ainsi qu'une maturation des monocytes dérivés des cellules dendritiques humaines [124].

Même si l'induction d'une réponse immunitaire par les protéines SLPs n'a pas été clairement démontrée, des essais d'immunisations passives et actives ont été réalisés chez le modèle hamster montrant des résultats peu concluants [68, 69, 70, 125].

II.1.1.2. L'adhésine Cwp66

Cwp66 (*Cell Wall Protein* de 66 kDa) est une protéine de surface formée de deux domaines comportant chacun trois motifs répétés. Le domaine C-terminal est un domaine très variable et il présente des homologies avec d'autres protéines de surface. Il a été d'ailleurs prouvé, par microscopie électronique, que cette partie de la protéine est exposée à la surface bactérienne. Le domaine N-terminal présente, lui, des homologies avec le domaine de reconnaissance du peptidoglycane de l'autolysine CwlB de *Bacillus subtilis*. Ce dernier est impliqué dans la fixation de la protéine CwlB à la paroi cellulaire bactérienne après sa sécrétion. La présence de telles homologies suggère donc que le domaine N-terminal de Cwp66 jouerait le même rôle.

Des anticorps dirigés contre les deux domaines de la protéine Cwp66, ainsi que les domaines N- et C-terminaux purifiés, inhibent partiellement l'adhésion de *C. difficile* aux cellules Vero en

culture lorsque les bactéries ont subi un choc thermique. Cette inhibition prouve donc que Cwp66 participe, en partie, au processus d'adhésion de *C. difficile* [126].

II.1.1.3. La protéine de choc thermique GroEL

La protéine GroEL de *C. difficile* est une protéine de 58 kDa faisant partie de la famille des protéines chaperonnes Hsp60 (*Heat Shock Protein*). Après un choc thermique à 48°C, GroEL est principalement localisée au niveau du cytoplasme, de la paroi bactérienne, ainsi que dans le milieu extracellulaire. Il a été proposé que la protéine soit exportée dans le milieu extracellulaire et puis adsorbée à la surface bactérienne.

GroEL est codée par le gène *groEL* de 1623 pb contenu dans l'opéron *groESL* (1940 pb). Le gène *groEL*, présent en une seule copie, est très conservé parmi les différentes souches de *C. difficile*.

Des anticorps dirigés contre la protéine GroEL, de même que la protéine purifiée, inhibent partiellement l'adhésion de *C. difficile* aux cellules Vero, après un choc thermique. L'expression de la protéine est également induite par simple contact cellulaire, sans aucun choc thermique. Ces résultats suggèrent que GroEL peut jouer un rôle dans l'adhésion de *C. difficile* [127].

II.1.1.4. La protéine CwpV : un possible rôle dans l'adhésion ?

La protéine CwpV est une protéine de surface de 167 kDa comprenant un peptide signal à son extrémité N-terminale, trois motifs PF04122 impliqués dans l'adhésion à la paroi cellulaire, une région riche en sérine/glycine et plusieurs domaines répétés dans la partie C-terminale. [128]. Le nombre et la séquence de ces domaines répétés sont variables entre les souches de *C. difficile* (figure 7). Il existerait, en effet, cinq types différents de ces domaines répétés [129]. L'expression de la protéine CwpV répond à un mécanisme de variation de phase et est contrôlée, grâce à la recombinaison RecV, par un système d'inversion d'ADN. Comme illustré dans la figure 8, la transcription du gène est stoppée quand il est en position OFF et ce grâce à la présence d'un terminateur intrinsèque au niveau de la région d'inversion. Cela se traduit par la formation d'une tige-boucle de l'ARN. En position ON, le terminateur est absent et le gène *cwpV* est transcrit en entier. Cette inversion nucléotidique se produit au niveau d'une séquence de 195 pb comprise

entre deux séquences inversées répétées de 21 pb chacune et qui sont situées à 57 pb en amont du gène *cwpV*. Le promoteur du gène *cwpV* est, lui, situé à 36-37 pb en amont de la séquence inversée (figure 8) [128, 129].

Au moment de la sécrétion de la protéine CwpV au travers de la membrane cellulaire, probablement via le système de translocation SecA2 [130], la protéine CwpV subit un premier clivage permettant la libération du peptide signal. Puis, la protéine subit un deuxième clivage auto-protéolytique au niveau de la thréonine 413 générant deux sous-unités de 40 kDa et 120 kDa. Les deux sous-unités se réassocient par la suite pour former un complexe à la surface de la cellule bactérienne où la liaison est assurée par la partie N-terminale de la protéine (figure 9) [129, 131]. Ce mécanisme est conservé entre les différents types de CwpV et il semblerait qu'il soit aussi conservé pour toutes les protéines CWP [129].

CwpV fait partie des 28 paralogues de la protéine HMW-SLP qui sont regroupés dans la famille des CWP (Cell Wall Proteins) [132]. Chez *C. difficile*, quelques-unes de ces protéines, notamment la protéine Cwp66 et la protéase Cwp84, ont été associées au phénomène d'adhésion de la bactérie aux cellules hôtes [126, 133]. Les protéines HMW-SLP montrent aussi une forte adhésion aux cellules épithéliales humaines et murines et leur adhésion est inhibée par des anticorps anti- HMW-SLP [123]. Les homologies constatées entre ces protéines et CwpV laissent supposer l'existence d'homologies fonctionnelles. L'expression de CwpV ne semble cependant pas modifier la capacité d'adhésion de *C. difficile* aux cellules Caco-2. Il a été en revanche démontré que CwpV est capable d'induire l'agrégation des cellules bactériennes [129].

L'utilisation du système de variation de phase par certains pathogènes pour - à priori - échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et pour mieux s'adapter aux conditions hostiles de leurs environnements, laisse supposer que la protéine CwpV joue un rôle dans la pathogénicité de *C. difficile*.

II.1.1.5. La protéine de liaison à la fibronectine Fbp

La protéine Fbp (annotée Fbp68 pour la souche 79 685 de *C. difficile* et FbpA pour la souche 630) est une protéine de surface capable de fixer la fibronectine. Elle est également capable de se lier, dans une moindre mesure, à d'autres molécules de la matrice extracellulaire

(fibrinogène et vitronectine). Des essais d'immunofluorescence indirecte et des tests ELISA montrent l'aptitude de *C. difficile* à se lier à la fibronectine soluble ou immobilisée. Des anticorps dirigés contre la protéine Fbp68 purifiée inhibent partiellement l'adhésion de *C. difficile* à la fibronectine et aux cellules Véro, ce qui suggère l'implication de cette protéine dans le processus de colonisation de *C. difficile* aux cellules hôtes [134].

La protéine Fbp68 serait formée de deux domaines distincts compris entre les acides aminés 1-300 et 480-570, avec une région intermédiaire présentant une conformation en super-hélice (figure 10). Fbp68 ne possède pas de peptide signal. La protéine est codée par le gène *fbp68* de 1773 pb qui est présent en une seule copie dans le génome. Le gène est hautement conservé entre les souches [134].

Une étude biochimique a permis d'identifier les domaines de liaison entre la fibronectine et la protéine Fbp68. Celle-ci se lierait au domaine N-terminal de la fibronectine grâce à 194 résidus d'acides aminés localisés à sa partie C-terminale. L'étude a également souligné l'importance du manganèse dans le processus de liaison de la protéine à la fibronectine [135].

De façon générale, les protéines de liaison à la fibronectine appartiennent à la famille MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) regroupant les protéines qui se lient aux différents composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, le fibrinogène, l'élastine, la vitronectine, la laminine et bien évidemment la fibronectine. Ces protéines interagissent donc spécifiquement avec la fibronectine, une glycoprotéine formée de deux sous-unités de 230-270 kDa chacune et qui sont liées, à leurs extrémités C-terminales, par deux ponts disulfures. La fibronectine est codée par un seul gène qui est par la suite épissé en trois sites différents pour générer les deux sous-unités majeures de la fibronectine. Chaque sous-unité comporte trois types de modules répétés de structures différentes (types I, II et III) (figure 11). Ces modules sont impliqués dans les interactions avec les autres composants de la matrice extracellulaire, dans la liaison avec les récepteurs cellulaires (les intégrines) et avec la fibronectine elle-même [136]. La fibronectine peut être sécrétée par les hépatocytes et se trouver à l'état soluble au niveau du plasma ou être sécrétée par des fibroblastes et s'associer à une matrice fibrillaire à la surface cellulaire. La fibronectine contribue à l'organisation de la matrice extracellulaire et à l'adhésion cellulaire. En plus de son rôle de molécule majeure de l'adhérence cellulaire avec le tissu conjonctif, elle intervient dans la

communication cellulaire. La liaison fibronectine-intégrines membranaires peut activer des voies de transduction du signal (via des protéines kinases ou des protéines du cytosquelette) modifiant le comportement cellulaire (par exemple prolifération, différenciation, mobilité). Ainsi, la fibronectine joue un rôle fondamental au cours de l'embryogénèse et dans de multiples processus physiologiques (cicatrisation, hémostase, angiogénèse) ou pathologiques (inflammation, cancérogénèse) [136].

Les protéines de liaison à la fibronectine ont été largement étudiées chez certaines espèces bactériennes et plus particulièrement chez des pathogènes à Gram positif. Ces bactéries peuvent contenir une ou plusieurs protéines de liaison à la fibronectine avec des rôles plus ou moins définis. La plupart de ces protéines ont été néanmoins associées au pouvoir adhésif de certaines bactéries, ainsi qu'à leur capacité d'internalisation. Il a été en effet montré que certaines protéines de liaison à la fibronectine de *Streptococcus pyogenes* sont capables de médier leur adhésion à des cellules épithéliales buccales, respiratoires ou cutanées [137, 138, 139, 140, 141], et qu'elles sont aussi impliquées dans le processus d'internalisation dans les cellules épithéliales [142, 143, 144, 145]. Des mutants dépourvus de certaines de ces protéines induisent également une plus faible mortalité chez les souris [146, 147]. Chez *Staphylococcus aureus*, les protéines de liaison à la fibronectine ont été associées à l'adhésion de *S. aureus* aux cellules endothéliales, aux plaquettes, ainsi qu'à leur adhésion *ex vivo* à des biomatériaux restés longuement au contact de l'hôte [148, 149, 150, 151, 152]. Ces protéines ont été également incriminées dans le pouvoir invasif de *S. aureus* [153, 154, 155, 156, 157, 158]. Les protéines de liaison à la fibronectine seraient également impliquées dans le processus d'adhésion et de virulence d'autres espèces bactériennes comme *S. pneumoniae*, *S. gordonii* ou encore *Listeria monocytogenes* [159, 160, 161, 162, 163].

Très peu d'études ont été, cependant, réalisées chez les clostridies et encore moins chez *C. difficile*, chez qui la protéine Fbp a été simplement identifiée et son rôle dans l'adhésion cellulaire a été tout juste suggéré. Des études supplémentaires sont donc indispensables pour mieux comprendre l'implication de cette protéine dans le mécanisme d'adhésion de *C. difficile* et dans sa virulence de façon générale. La construction d'un mutant ne produisant plus cette protéine est donc une alternative importante et nécessaire pour espérer répondre à cette question.

Une partie du travail expérimental présenté dans ce manuscrit concerne cet aspect du rôle de FbpA chez *C. difficile*.

II.1.2. Les enzymes à activité protéolytique

II.1.2.1. La protéase Cwp84

Outre les facteurs d'adhérence aux tissus cibles, *C. difficile* présente une activité protéolytique de surface qui pourrait jouer un rôle important dans sa physiopathologie. La protéine Cwp84 a été en effet identifiée comme l'une des enzymes protéolytiques de *C. difficile*. Il s'agit d'une Cystéine protéase de 84 kDa qui possède une structure en trois domaines : un peptide signal, un domaine C-terminal homologue au domaine d'ancrage de Cwp66 et un domaine N-terminal à activité catalytique [164]. La protéine Cwp84 est localisée à la surface bactérienne en association avec les protéines SLPs de la couche S [133]. Elle est codée par le gène *cwp84* qui est présent en aval du gène *cwp66* sur le cluster décrit précédemment (sous-chapitre II.1.1.1. Protéines de la « couche S ») [121]. Le gène, extrêmement conservé au sein de l'espèce, est fortement transcrit sous forme monocistronique en début de phase exponentielle [122].

La protéine Cwp84 présente une activité protéolytique sur la gélatine et la BAPNA (N-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hypochloride), substrat type de la trypsine, et elle est capable de dégrader certains composés de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et la vitronectine [133, 164]. Cette activité protéolytique pourrait donc servir à *C. difficile* à déstabiliser l'intégrité des tissus hôtes et à faciliter son implantation. De plus, Cwp84 est immunogène chez des patients infectés par *C. difficile* [164]. Par ailleurs, Cwp84 est impliquée dans la maturation du précurseur des protéines SLPs (figure 3), ainsi que dans l'ancrage correct d'autres protéines de surface de type CWP [117, 119, 165]. Cwp84 joue donc un rôle très important dans l'intégrité et le maintien de la structure de la cellule bactérienne, à en juger surtout par la forte sensibilité à la lyse bactérienne en présence d'inhibiteurs de Cwp84. Cette sensibilité à la lyse pourrait aussi se traduire par un manque de viabilité surtout en cas de stress, puisqu'en milieu riche la bactérie mutée en son gène *cwp84* et la bactérie sauvage incubée avec des inhibiteurs de la protéine semblent avoir une croissance quasi normale [117, 119]. D'après

Kirby et coll., le rôle de Cwp84 dans l'établissement de l'infection à *C. difficile* est beaucoup moins évident. En effet, des tests *in vivo* réalisés sur le modèle hamster attestent de l'absence de différence de symptômes entre les animaux infectés par la souche sauvage et ceux infectés par le mutant ne produisant pas la protéine Cwp84 [117].

Pour être active, la protéase Cwp84 subit un processus de maturation. Selon de la Riva et coll., cette maturation se produit suite au clivage du peptide signal par une certaine peptidase générant ainsi une pro-enzyme de 84 kDa, suivi d'un deuxième clivage donnant naissance à l'enzyme mature et active de 77 kDa [165]. Des travaux effectués dans notre laboratoire montrent que le processus de maturation de Cwp84 est plus complexe. Il implique une série de clivages séquentiels qui commence au niveau de la Lysine 518 du domaine C-terminal, suivi par un ou plusieurs clivages dans le domaine N-terminal, majoritairement au niveau de la Serine 92, et qui aboutissent à la formation de l'enzyme mature de 47 kDa (figure 12) [166]. La forme de 77 kDa n'est qu'une forme intermédiaire identifiée à la surface bactérienne associée aux protéines de la couche S. Cette forme correspondrait à la protéine totale ayant perdu son pro-peptide, probablement sous l'action partielle de la protéine Cwp13 comme cela a été suggéré par de la Riva et coll. [165]. La localisation de cette forme suggère qu'elle est impliquée dans la maturation des protéines de la couche S. La forme mature de 47 kDa, générée vraisemblablement par clivage auto-protéolytique, est majoritairement localisée dans la fraction extracellulaire, ce qui indique que cette forme définitive est plutôt impliquée dans la dégradation des produits de la matrice extracellulaire ; en revanche cela n'exclut nullement la possibilité de son implication dans la maturation des protéines SLPs, surtout que Cwp84 peut se réassocier à la cellule bactérienne [166]. Le modèle de maturation de Cwp84 proposé par notre équipe est décrit dans la figure 13.

II.1.2.2. La protéase Cwp13

La protéine Cwp13 est un paralogue de la protéine Cwp84 appartenant vraisemblablement à la famille des Cystéines protéases. Elle présente 63,2 % d'identité protéique avec la protéine Cwp84. Elle est codée par le gène *cwp13* qui présente 70,4 % d'identité de séquence avec le gène *cwp84* et qui est localisé en dehors du cluster de gènes comprenant *slpA*, *cwp84* et 10 autres gènes *cwps* [165].

La protéine Cwp13 subit une auto-maturation suite à la libération du peptide signal (les 30 premiers acides aminés) et suite à l'auto-clivage du pro-peptide au niveau de la thréonine 84 et l'alanine 85. Il a été proposé que la protéine Cwp13 active participerait par la suite à la maturation de Cwp84, selon un processus non encore connu, et interviendrait dans la dégradation des protéines SLPs mal repliées en clivant leurs domaines de liaison à la paroi cellulaire et en les empêchant de s'y accrocher (figure 14) [165].

II.1.3. Les protéines flagellaires

II.1.3.1. Structure globale des flagelles

Aucune étude structurale du flagelle n'a été réalisée pour *C. difficile*, mais selon son organisation génétique sa structure s'apparenterait à celle de *Bacillus subtilis*. On peut considérer que le flagelle est subdivisé en cinq parties : (i) le moteur flagellaire qui contrôle le mécanisme de rotation des flagelles ; (ii) le corps basal enfoui dans la cellule et dont la structure diffère entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif ; (iii) le crochet qui fait la liaison entre le corps basal et le filament ; (iv) le filament composé principalement d'une seule protéine, la flagelline, et qui est recouvert à l'extrémité par une coiffe ; et (v) l'appareil d'export flagellaire qui permet principalement le transport des protéines flagellaires (figure 15) [167].

II.1.3.2. Rôle des flagelles dans la pathogénicité

De façon générale, les flagelles jouent un rôle très important dans la mobilité bactérienne, dans l'adaptation aux niches biologiques et dans l'accès des pathogènes aux tissus cibles [168]. Les flagelles ont été associés au processus d'adhésion et de colonisation de plusieurs bactéries dont *Helicobacter pylori* [169, 170], *Aeromonas caviae* [171] et *Escherichia coli* [172]. Ils ont été également décrits comme médiateurs d'invasion chez *Salmonella enterica serovar Typhi* [173, 174], *Borrelia burgdorferi* [175], *Yersinia enterocolitica* [176] et *Pseudomonas aeruginosa* [177, 178]. Outre leur rôle dans la mobilité, les flagelles ont été aussi impliqués dans le processus de virulence de *Vibrio cholerae* [179] et de *Compylobacter jejuni* [180]. Cette dernière bactérie serait capable, grâce aux flagelles, de coloniser le mucus du tractus intestinal et de sécréter, en plus des protéines flagellaires, d'autres protéines de virulence [180]. D'autres

pathogènes, comme *Bacillus thuringiensis*, peuvent également exporter des facteurs de virulence grâce à leur appareil de sécrétion des flagelles [181, 182]. De plus, les flagelles ont été associés à la formation et à la maturation de biofilms chez certaines espèces bactériennes [183, 184, 185, 186, 187, 188].

Vu l'importance des flagelles, autant dans le mécanisme de mobilité que dans les phénomènes d'adhésion et de virulence constatés chez certaines bactéries (figure 16), il paraît important d'élucider le rôle des flagelles dans la pathogenèse de *C. difficile* et comparer ce rôle entre différentes souches. L'étude du rôle de différents composants du flagelle de *C. difficile*, et plus particulièrement de la flagelline FliC, dans le processus de colonisation et de virulence fera donc partie de ce travail de thèse.

II.1.3.3. Données connues sur les flagelles de *C. difficile*

Le gène *fliC* codant 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* [189, 190, 191]. Des protéines recombinantes FliC et FliD, ainsi qu'une préparation flagellaire globale 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 radio-marquées. *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* [192]. Des mutants non mobiles de la souche 630 Δ erm, dont les gènes *fliC* et *fliD* ont été inactivés, présentent toutefois une meilleure adhésion aux cellules en culture Caco-2, ainsi qu'une virulence accrue dans le modèle hamster. Ce résultat inattendu a poussé les auteurs à émettre deux hypothèses en supposant l'absence d'implication des flagelles dans le processus de virulence ou en considérant le processus de répression de la mobilité comme une stratégie de pathogénicité employée par la bactérie [193].

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* [194].

II.1.4. Autres protéines à propriétés adhésives potentielles

Tout au long des études réalisées sur les quelques protéines de surface caractérisées, il a été constaté que l'effet de l'une ou l'autre de ces protéines était partiel, ce qui veut dire que le phénomène de colonisation est un phénomène multifactoriel qui fait intervenir plusieurs adhésines. Vingt huit paralogues des protéines SLPs ont été d'ailleurs identifiés mais seuls quelques uns ont été étudiés et leurs rôles dans la colonisation de *C. difficile* établis [132]. Les gènes de 11 de ces paralogues sont localisés au niveau du cluster de gènes *cwps* déjà décrit et les 17 autres sont localisés dans le reste du génome. Ces protéines partagent la même structure en trois domaines avec les mêmes motifs répétés PFam04122 qui permettent la liaison de ces protéines à la paroi cellulaire, d'où leur nom CWP pour *Cell Wall Proteins*. Quelques études transcriptomiques et protéomiques montrent l'expression des gènes et de quelques unes de ces protéines dans des conditions de laboratoire [195, 196]. Certaines d'entre elles induisent même une réaction immunitaire chez des patients atteints d'ICD [68]. Ces protéines pourraient donc avoir des activités semblables à celles déjà caractérisées et être tout aussi impliquées dans le processus d'adhésion et de colonisation de *C. difficile*.

II.2. Les toxines

II.2.1. Les toxines TcdA et TcdB

II.2.1.1. Structure

Les toxines TcdA et TcdB sont deux polypeptides de haut poids moléculaire, 308 kDa et 269,9 kDa, et comprenant 2710 et 2366 acides aminés, respectivement. Elles appartiennent à la famille des LCTs (*Large Clostridial Toxins*), famille de toxines clostridiales comprenant notamment les toxines létales de *Clostridium sordellii* et la α -toxine de *Clostridium novyi*, qui agissent au niveau de leur cible grâce à leur activité glucosyl-transférase. Jusque là, la structure des deux toxines a été considérée, sur la base des séquences en acides aminés, comme une structure tripartite avec trois domaines distincts, mais des études récentes indiquent que ces toxines présentent plutôt une structure multi-modulaire selon un modèle ABCD (A, *biological activity* ; B, *binding* ; C, *cutting* ; D, *delivery*). Les toxines TcdA et TcdB sont donc constituées de 4 domaines : un domaine N-terminal responsable de l'activité enzymatique toxique (A), un

domaine de liaison C-terminal (B), un domaine transmembranaire impliqué dans la translocation des toxines au niveau du cytoplasme (D) et enfin un domaine auto-catalytique avec une activité Cystéine protéase (C) [197, 198] (figure 17).

La partie C-terminale du domaine de liaison (B) est constituée d'éléments répétitifs d'oligopeptides, appelés CROPS (*Combined Repetitive Oligopeptides*). Ces peptides présentent des homologies avec des régions de liaison aux sucres permettant la liaison des glycosyltransférases à leurs cibles et également avec les domaines de reconnaissance des cholines de certains composants des protéines de surface [199]. Ces homologies laissent supposer que les toxines se lient à leurs récepteurs au niveau d'oligosaccharides. Il a été d'ailleurs démontré que l'oligosaccharide « Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc » se lie à la toxine TcdA chez l'animal [200, 201]. Ce trissaccharide n'est cependant pas présent chez l'homme où le gène codant la galactose- β 3-transférase est absent [202]. La nature du ou des récepteur(s) de la toxine TcdA n'est donc toujours pas entièrement défini, et encore moins pour la toxine TcdB.

Peu de données structurales sont disponibles pour le domaine N-terminal (A), responsable de la glycosylation des protéines Rho. Récemment, la structure cristallographique du domaine (A) de la toxine TcdB a été déterminée [203]. Dans la souche VPI 10463 de *C. difficile*, il a été démontré que le domaine (A) de TcdB, qui est libéré dans le cytosol, comprend les 543 premiers acides aminés [204]. Parmi ces acides aminés, cinq semblent être nécessaires pour l'activité enzymatique (Asp²⁷⁰, Arg²⁷³, Tyr²⁸⁴, Asn³⁸⁴ et Trp⁵²⁰) et quatre autres paraissent importants pour la reconnaissance enzyme-substrat (Arg⁴⁵⁵, Asp⁴⁶¹, Lys⁴⁶³ et Glu⁴⁷²) [205].

Le domaine C (dit CPD : *Cystein Protease 'C' Domain*) est un domaine auto-catalytique permettant la libération du domaine (A) vers le cytosol en présence d'InsP₆ (*inositol hexakisphosphate*). Ce domaine serait localisé entre les résidus 543 et 769 de la toxine TcdA et entre les résidus 543 et 767 de la toxine TcdB. Shen et coll. ont récemment déterminé la structure du domaine (C) de TcdB qui montre une grande similitude structurale avec celle de TcdA. La comparaison des deux structures montre 56 % d'identité de séquence, avec des sites actifs conservés et les mêmes sites de liaison à l'InsP₆ [206]. Le domaine (D), quant à lui, comprend une région hydrophobe prédisant une activité transmembranaire et probablement donc un rôle dans la translocation de la partie active des toxines vers le cytosol. Sa structure n'est pas encore

déterminée, probablement à cause de sa nature hydrophobe rendant sa purification et sa cristallisation difficiles.

II.2.1.2. Organisation génétique du locus PaLoc

Les toxines TcdA et TcdB sont codées respectivement par les gènes *tcdA* et *tcdB* présents sur le locus de pathogénicité PaLoc (19,6 kb). Ce locus comprend, en plus, trois autres gènes dont deux gènes régulateurs, *tcdR* et *tcdC*, et un troisième gène, *tcdE*, qui pourrait être impliqué dans la libération des deux toxines TcdA et TcdB [207, 208]. Tous les gènes, excepté le gène *tcdC*, ont la même orientation (figure 18). L'analyse transcriptionnelle du locus PaLoc a montré que les quatre gènes *tcdR-tcdB-tcdE-tcdA* peuvent être cotranscrits, vraisemblablement à partir du promoteur de *tcdR*, et que les gènes *tcdA* et *tcdB* peuvent également être spécifiquement transcrits à partir de leurs propres promoteurs [209-211].

Le gène *tcdR* (anciennement dénommé *tcdD* ou *txeR*) code la protéine TcdR qui régule positivement la transcription des toxines TcdA et TcdB. TcdR est un facteur sigma alternatif appartenant à la famille σ^{70} et qui agit sur l'ARN polymérase en favorisant sa liaison aux promoteurs des gènes de toxines [212, 213]. TcdR active également sa propre expression [214].

Le gène *tcdC* code la protéine TcdC, un régulateur négatif qui inhibe l'expression des toxines TcdA et TcdB en empêchant la reconnaissance des promoteurs de toxines par le complexe TcdR-ARN polymérase [215, 216].

Le gène *tcdE* est un gène de 501 pb dont l'expression dans *Escherichia coli* conduit à la mort cellulaire. Son rôle dans le relargage des toxines TcdA et TcdB dans le milieu environnant a été d'abord suggéré, en raison des similitudes entre la protéine TcdE et des protéines phagiques catalytiques, appelées holines, qui sont capables de lyser les cellules hôtes et de libérer, par conséquent, les nouveaux phages [217]. La construction et la caractérisation d'un mutant d'inactivation du gène *tcdE* est venue par la suite confirmer cette hypothèse. La protéine TcdE permettrait ainsi la sécrétion des deux toxines TcdA et TcdB sans toutefois provoquer de lyse cellulaire [218]. Mais, ces observations contredisent les résultats d'une autre étude qui montre que l'inactivation fonctionnelle de *tcdE* chez *C. difficile* n'induit aucune modification ni au

niveau de la croissance bactérienne, ni au niveau de la sporulation, ni dans le relargage des toxines TcdA et TcdB [219].

II.2.1.3. Mécanisme d'action et effets physiopathologiques

La première étape du mode d'action des deux toxines TcdA et TcdB est la reconnaissance d'un récepteur membranaire, encore mal défini, à la surface des cellules eucaryotes. Puis les toxines sont internalisées par endocytose [220]. L'acidification des vésicules d'endocytose favorise par la suite le changement de conformation de la toxine et l'insertion de son domaine central hydrophobe dans la membrane de l'endosome [221, 222]. Il se forme alors un pore au travers duquel seul le domaine catalytique est transloqué vers le cytosol [204, 223]. Il a été récemment montré que les toxines TcdA et TcdB subissent un clivage auto-catalytique grâce à une activité Cystéine protéase utilisant l'inositolphosphate, $InsP_6$, comme cofacteur [224, 225]. Le domaine Cystéine protéase serait alors régulé de façon allostérique par l' $InsP_6$ cytosolique [206]. Après internalisation, les toxines ciblent principalement les petites protéines G de la famille Rho, dont les principaux partenaires sont Rho, Rac et Cdc42. Ces protéines G constituent des « switches » ou des interrupteurs moléculaires qui contrôlent dans le temps, les voies de signalisation cellulaire. Elles alternent, pour cela, entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Les toxines TcdA et TcdB vont agir au niveau de Thr-37 pour Rho et Thr-35 pour Rac et Cdc42 en y fixant de façon covalente un glucose [226, 227]. Cette glucosylation bloque la protéine G dans sa configuration inactive et empêche la reconnaissance des effecteurs en aval ; ainsi, les toxines inhibent les protéines G de façon permanente. Etant donné leur rôle fondamental sur la régulation de la croissance cellulaire, de la formation du cytosquelette d'actine, du trafic cellulaire et du maintien des jonctions intercellulaires, leur inhibition entraîne une désorganisation du cytosquelette cellulaire. Cette perte de l'architecture structurale se traduit par une dépolymérisation des filaments d'actine, un arrondissement des cellules et une altération des jonctions intercellulaires avec augmentation de la perméabilité des barrières épithéliales et endothéliales. L'altération architecturale en soi peut faire entrer la cellule dans une cascade apoptotique aboutissant à la mort cellulaire [197, 199, 207]. De plus, par l'intermédiaire de Rho, Rac et Cdc42, les toxines TcdA et TcdB activent des voies pro-inflammatoires médiées par des phospholipases, la protéine-kinase C et des MAP-kinases (*Mitogen-Activated Protein kinases*) [228-231]. La réaction inflammatoire et la perte d'intégrité

de la barrière favorisent un recrutement important de neutrophiles participant au processus pathogénique de *C. difficile* [232].

Les différentes étapes du mécanisme d'action des toxines TcdA et TcdB sont résumées dans la figure 19.

II.2.1.4. Régulation de la production de toxines

II.2.1.4.1. Facteurs environnementaux

La synthèse des toxines dépend de la phase de croissance de *C. difficile* et est influencée par la composition du milieu de culture et par certains facteurs environnementaux. Les toxines TcdA et TcdB sont fortement exprimées en début de phase stationnaire de croissance. Cette expression, ainsi que le taux de production des toxines, sont inhibés par l'ajout de glucose ou de sucres rapidement métabolisables [209, 233]. D'ailleurs, un système de répression catabolique régulé par la protéine CcpA a été identifié chez *C. difficile* [234]. La production de toxines est également affectée par la présence de certains acides aminés et plus particulièrement la cystéine [233, 235-239], ainsi que la biotine [240]. Un possible lien entre la synthèse des purines et la production de toxines a été, également, évoqué par Maegawa et coll. [241].

D'autres facteurs de stress interviennent dans le contrôle de la production des toxines comme la température ou l'exposition à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. La production de toxines est maximale à 37°C et faible à 22°C et 42°C. La température agirait à l'échelle transcriptionnelle, en favorisant l'auto-induction du régulateur TcdR [242]. Certains antibiotiques ont été également associés à une production précoce et plus importante de toxines, notamment la vancomycine, la pénicilline et le linezolide [243, 244]. D'autres études montrent, toutefois, des résultats assez contradictoires surtout concernant la clindamycine. Certaines de ces études s'accordent à dire que la clindamycine n'aurait pas d'effet sur la production des toxines [243-245] contrairement à d'autres qui prouvent le contraire [246, 247]. Globalement, l'effet des antibiotiques paraît différent et ce en fonction de la méthode d'analyse utilisée, du moment d'ajout de l'antibiotique et surtout du type de souche testé.

II.2.1.4.2. Systèmes régulateurs

L'expression des toxines TcdA et TcdB est régulée par deux protéines régulatrices TcdR et TcdC codées respectivement par les gènes *tcdR* et *tcdC* situés au sein du même locus de pathogénicité PaLoc (figure 18). Le facteur sigma TcdR active la transcription des deux toxines TcdA et TcdB, ainsi que sa propre transcription *via* l'un de ses deux promoteurs [212, 214]. Cette auto-régulation positive indique, cependant, l'existence d'autres éléments qui permettraient la régulation même de la transcription de *tcdR* ou l'activité de TcdR en cas de condition favorable à la production de toxines. Il existe, en effet, la protéine TcdC qui régule négativement l'expression des deux toxines, et ce en interférant entre la protéine TcdR contenant l'ARN polymérase et ses promoteurs [216].

Un autre régulateur, CodY, est aussi capable de se fixer au promoteur de TcdR et de réprimer l'expression des deux toxines TcdA et TcdB. Cette liaison au promoteur de TcdR est favorisée par la présence de GTP et d'acides aminés branchés [248]. Le rôle de CodY n'est cependant pas limité à la régulation de synthèse des toxines. Selon une étude transcriptomique réalisée sur un mutant de CodY, cette protéine serait également impliquée dans la biosynthèse des acides aminés, le transport des nutriments et la fermentation [249]. Cette co-régulation entre des gènes métaboliques et des gènes de virulence, par CodY, laisse supposer un lien entre la suffisance nutritionnelle et la pathogénicité de *C. difficile*. Ce lien a été vérifié avec l'identification d'un autre régulateur, CcpA (*Catabolite Control Protein A*), protéine à répression catabolique. Il a été prouvé que CcpA est capable de réprimer l'expression des deux toxines TcdA et TcdB en réponse à la présence de sucres, et plus précisément de sucres à PTS (*Phospho-Transferase System*) [234]. Pour cela, CcpA interagit avec la région promotrice ou la région 5' terminale des gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC* et *tcdR* [250].

En plus du lien établi entre la virulence et le métabolisme énergétique, il existerait également une corrélation entre l'expression de toxines et la sporulation. Cette corrélation a été, initialement, évoquée par Kamiya et coll. qui ont montré une nette diminution du taux de sporulation et du taux de production des toxines après ajout d'un inhibiteur de sporulation, et ce malgré l'absence de variation des formes végétatives [251]. Karlsson et coll. ont également évoqué ce lien suite à leur analyse protéomique qui leur a permis d'identifier 40 protéines exprimées conjointement avec les toxines TcdA et TcdB. La plupart de ces protéines sont des protéines impliquées dans le

métabolisme carboné (succinate, métabolisme du CO/folate et du butyrate). Il y aurait également une surexpression simultanée des gènes des deux facteurs sigma TcdR et SigH avec les gènes *tcdA* et *folD* (opéron CO/folate), SigH étant un régulateur qui intervient dans le contrôle de la phase de transition et d'initiation de la sporulation [233]. Un mutant SigH, construit peu de temps après par Saujet et coll., montre une production nulle de spores et une forte surexpression de *tcdA*, *tcdB* et *tcdR* ainsi qu'une forte production de TcdA. SigH semble donc contrôler l'expression de gènes de sporulation, ainsi que l'expression de gènes de virulence ; mais d'après cette analyse le phénomène de sporulation et la capacité de production de toxines ne seraient vraisemblablement pas associés [252].

Spo0A, régulateur de l'initiation de la sporulation, ainsi que la voie de signalisation modulant son activité sont aussi impliqués dans la régulation de la synthèse des toxines chez *C. difficile*. En effet, un mutant Spo0A et un autre mutant d'une histidine kinase (codée par le gène CD2492), responsable de la phosphorylation de Spo0A, ont été construits dans la souche 630 Δ erm de *C. difficile*. Ils montrent, tous deux, une diminution importante de la production de toxines [253]. Cette diminution est 100 fois plus importante pour le mutant Spo0A que pour le mutant de l'histidine kinase. L'effet de l'inactivation de Spo0A et de SigH est complètement différent. Alors que la mutation de Spo0A réduit la production de TcdA, celle de SigH la stimule via le contrôle de sa transcription. Par ailleurs, aucun motif de liaison à Spo0A ni de promoteur pour SigH n'a été identifié en amont de *tcdA*, *tcdB* ou *tcdR*, ce qui indique un effet indirect de ces deux protéines sur l'expression des gènes de toxines de *C. difficile*.

Un autre type de régulation faisant appel au système de « quorum sensing », a été également identifié chez *C. difficile*. Le « quorum sensing » (= déclenchement par un seuil) étant un système de communication intercellulaire où une molécule de signalisation est secrétée dans l'environnement extracellulaire et dont l'accumulation agit comme un signal de densité cellulaire qui sera à l'origine d'une réponse spécifique. Chez *C. difficile*, il existe deux systèmes différents de « quorum sensing » identifiés à ce jour : le système « agr » et le système LuxS/auto-inducteur-2 [254, 255]. Ce dernier aurait un rôle dans la régulation de la transcription des gènes de virulence *tcdA*, *tcdB* et *tcdE* en début de phase stationnaire, mais n'aurait pas d'effet sur leur expression [255, 256]. Aucune étude spécifique n'a cependant été réalisée pour le système « agr ».

Le système de régulation des toxines semble être un système très compliqué, influencé par plusieurs facteurs environnementaux et dépendant de plusieurs facteurs de régulation. Beaucoup d'études sont encore nécessaires pour essayer de mieux comprendre ce phénomène.

II.2.1.5. TcdA et/ou TcdB : quelle toxine est essentielle pour la virulence ?

Pendant des années, la communauté scientifique s'accordait sur l'importance de la toxine TcdA et sur son rôle majeur dans la virulence de *C. difficile*. Des expériences fondées sur l'utilisation de protéines purifiées ont montré l'implication de la toxine TcdA dans l'apparition des symptômes d'infections à *C. difficile* dans le modèle hamster, ainsi que chez le lapin [257-259]. Chez les hamsters infectés avec *C. difficile* par voie intra-gastrique, la toxine TcdB n'aurait d'effet que lorsqu'elle est co-administrée avec des concentrations sub-létales de la toxine TcdA, ce qui suggère que les deux toxines agissent en synergie [258]. Des essais de vaccination avec des anatoxines de la toxine TcdA ont également montré une protection totale des animaux contre les infections à *C. difficile* [260, 261]. Mais, l'indentification, au début des années 1990, de nouvelles souches cliniques pathogènes qui produisent la toxine TcdB et non la toxine TcdA (A-B+) a remis en cause toute la théorie concernant l'importance relative de chaque toxine dans les ICD [262-264]. Certaines de ces souches sont, en effet, aussi pathogènes voire plus pathogènes que les autres souches productrices des deux toxines (A+B+) [265]. Savidge et coll. ont également montré, dans un modèle de souris greffées de cellules intestinales humaines, que la toxine TcdB purifiée est capable d'induire une altération des cellules épithéliales intestinales, une augmentation de la perméabilité des muqueuses, une stimulation de la synthèse d'IL-8 et une inflammation aigüe [266]. Depuis peu, grâce à l'amélioration des outils génétiques, les gènes codant les toxines ont pu être inactivés et les mutants générés ont pu être étudiés dans le modèle hamster. Dans une première étude réalisée par Lyras et coll., des mutants des gènes *tcdA* et *tcdB* ont été construits par recombinaison homologue dans la souche 630E. Dans cette étude, le mutant TcdA provoque le même taux de mortalité chez les hamsters que la souche sauvage, alors que le mutant TcdB ne montre que 22 % de mortalité. Les auteurs concluent que la toxine TcdB est déterminante dans la virulence de *C. difficile*, ce qui ne serait pas le cas de la toxine TcdA [267]. Paradoxalement, une autre étude réalisée par Kuehne et coll. montre que les deux toxines sont aussi importantes l'une que l'autre. Pour cela, ils ont également construits des mutants Tcd A-B+, Tcd A+B- et un double mutant Tcd A-B- dans la souche 630 Δ erm, et ce grâce à la

technique du ClosTron. Leur mutant Tcd A-B⁺ provoque des symptômes d'infection à *C. difficile* sous 1 à 1,3 jours. Le mutant Tcd A⁺B⁻ développe aussi les mêmes symptômes, mais seulement au bout de quatre jours [268]. Pour cette équipe, les deux toxines ont donc un rôle dans la virulence de *C. difficile*. Tous ces résultats sont à l'origine d'une certaine confusion quant au(x) rôle(s) des deux toxines TcdA et TcdB dans les ICD. La ou les raison(s) qui expliquent cette différence ne sont pas encore claires. Certaines hypothèses ont été émises par rapport aux techniques d'inactivation des gènes, la méthode d'évaluation des effets des toxines (détermination de la mortalité ou évaluation des symptômes de la maladie), ou encore la différence génétique entre les deux souches testées. Les deux équipes sont, en effet, parties de la même souche 630 ; mais celle-ci a été rendue sensible à l'érythromycine, par plusieurs repiquages successifs sur milieu non sélectif, séparément dans chaque laboratoire. Il est possible que d'autres mutations aient eu lieu au moment des repiquages, surtout que les deux équipes n'ont pas réussi à compléter leurs mutants. Lyras et coll. ont, en revanche, réussi à obtenir plusieurs mutants du même gène et ils ont pu, par conséquent, confirmer leurs résultats. Il a été également démontré que les deux souches présentent des différences phénotypiques [268] et que la souche utilisée par Kuehne et coll. produit trois fois plus de toxines que la souche utilisée par Lyras et coll. [269].

Quoiqu'il en soit, des études complémentaires sont vraiment nécessaires pour essayer de mieux comprendre le rôle de ces deux toxines. Entre temps, il semble important de reconsidérer l'importance des deux toxines et de ne négliger aucune d'entre elles pour le développement des approches de diagnostic et de thérapeutique.

II.2.2. La toxine binaire

En plus des toxines TcdA et TcdB, certaines souches de *C. difficile* synthétisent un autre type de toxine, la toxine CDT (= *Clostridium difficile* Transférase), dite toxine binaire car nécessitant deux sous-unités l'une catalytique et l'autre enzymatique. Cette toxine fait partie de la famille des toxines à activité ADP-ribosyltransférase ciblant l'actine et qui comprend la toxine C₂ de *C. botulinum* et la toxine Iota de *C. perfringens* [270]. La toxine binaire de *C. difficile* est donc composée d'un élément enzymatique CDTa (48 kDa) et d'un élément de liaison CDTb (99 kDa) codés respectivement par les gènes *cdtA* et *cdtB* situés au sein du locus CdtLoc (6,2 kb). Ce

locus comprend, en plus, un gène *cdtR* codant une protéine régulatrice, CdtR, qui active la production de la toxine binaire (figure 20) [271]. Certaines souches de *C. difficile* (comme la souche 630 ou la souche VPI 10463) possèdent, dans leur génome, des parties de séquence des gènes *cdtA* et *cdtB* mais avec une délétion de 2 kb située dans la partie C-terminale de CDTa [272].

La prévalence des souches exprimant les deux sous-unités de la toxine binaire est évaluée à 6 % par Gonçalves et coll. [273]. La production de cette toxine par certaines souches a été associée à des cas d'ICD plus ou moins graves [274, 275]. Mais, son rôle dans la pathogénicité de *C. difficile* n'est toujours pas complètement établi. Il a déjà été démontré que la toxine binaire aurait un effet entérotoxique dans le modèle d'anses ligaturées de lapin, sans pour autant induire des symptômes de maladie chez le hamster [276]. Elle aurait également un effet cytotoxique sur cellules Vero [277] et elle induirait une augmentation de l'adhésion bactérienne par formation de protrusions associées aux microtubules à la surface des cellules épithéliales intestinales [278]. La toxine binaire serait même capable d'induire un taux de mortalité plus élevé, selon Bacci et coll. [279].

Le mécanisme d'action de la toxine binaire a été très peu étudié, mais il serait apparenté au mécanisme d'action des autres membres de la famille des ADP-ribosyltransférases. L'élément CDTb serait activé par clivage. Il formerait alors un heptamère à la surface cellulaire et il se fixerait sur des récepteurs spécifiques. Tout récemment, une équipe allemande a identifié le LSR (*Lipolysis-stimulated lipoprotein Receptor*) comme étant le récepteur membranaire de la toxine binaire de *C. difficile*. Une fois CDTb fixé au récepteur, CDTa se lie à CDTb et est internalisé par endocytose. Selon un mécanisme similaire à celui de TcdA et TcdB, CDTa est transloqué dans le cytosol après acidification de l'endosome. Cette étape est favorisée par la protéine Hsp90 et la cyclophiline [280]. D'après Gulke et coll., la partie N-terminale de CDTa est responsable de l'interaction avec CDTb et la partie C-terminale est responsable de l'activité enzymatique (figure 21) [281]. CDTa agirait, par la suite, en ribosylant les monomères d'actine G de façon irréversible. Cette ADP-ribosylation bloque la polymérisation de l'actine G en micro filament d'actine F et rompt l'équilibre entre les deux formes d'actine, ce qui provoque une ballonnisation des cellules et puis la mort cellulaire [198].

II.3. Autres facteurs de « virulence »

II.3.1. La spore

La formation des spores est un moyen important pour *C. difficile* de résister aux conditions défavorables et de se disséminer facilement dans le milieu environnant. C'est ce qui rend, entre autres, les infections à *C. difficile* aussi difficiles à contenir et à contrôler. Les spores sont en effet résistantes à la chaleur, aux radiations, aux produits chimiques et aux antibiotiques. Sans des conditions d'hygiène irréprochables, il est donc vraiment difficile d'empêcher la contamination par les spores de *C. difficile* surtout au contact de patients malades, du personnel soignant et/ou de matériel et surfaces potentiellement contaminés. Pour causer l'infection, les spores doivent cependant germer et cette germination est facilitée par la présence de sels biliaires contenus dans le tractus digestif. En condition de laboratoire, la germination des spores de *C. difficile* est facilitée par la présence de cholate ou de taurocholate, ainsi que par la présence de glycine [282, 283, 284]. La présence de chenodeoxycholate semble toutefois inhiber la germination [285]. Ces propriétés de germination peuvent être variables en fonction du type de souche de *C. difficile* [286].

L'examen des spores de *C. difficile*, par microscopie électronique de transmission, montre que celles-ci sont composées d'un exosporium (dans la majorité des cas), d'une paroi sporale dense avec une couche d'anneaux concentriques intérieurs, d'un cortex et d'un noyau comprenant des amas de ribosomes et une multitude de complexes nucléoprotéiques (figure 22) [287]. L'analyse protéomique des spores de la souche 630 de *C. difficile* révèle l'existence d'environ 336 polypeptides associés aux spores dont 88 sont communs aux clostridies et 29 sont spécifiques à *C. difficile*. La plupart de ces protéines sont impliquées dans les processus de traduction, sporulation/germination et dans la dégradation/stabilisation des protéines. Des protéines métaboliques associées à la production d'énergie sont aussi largement représentées [287]. Cinq protéines associées à la couche externe de la paroi des spores ont été également identifiées (CotA, CotB, CotCB, CotD et CotE). Trois d'entre elles présentent une activité catalytique. CotCB et CotD possèderaient une activité catalase et CotE aurait une double fonction chitinase et peroxydase. Les activités catalase et peroxydase pourraient être impliquées dans le pouvoir antioxydant des spores leur permettant de réduire la toxicité du H₂O₂. L'activité chitinase pourrait, quant à elle, jouer un rôle dans l'inflammation du tractus gastro-intestinal [288]. Un

orthologue d'une superoxyde dismutase, SodA, a été aussi identifié dans le génome de la souche 630 avec un rôle probable dans les liaisons covalentes entre les protéines sporales riches en tyrosine. Comme démontré chez *B. subtilis*, la protéine CotJB1 (à laquelle il a été attribué le nom de CotCA) pourrait être une des protéines-substrats de SodA surtout qu'elle est riche en tyrosine (10,34 % de tyrosines) [288].

Malgré l'importance du phénomène de sporulation, très peu d'études ont été consacrées à l'étude du cycle de sporulation chez *C. difficile*. A l'heure actuelle, à part l'identification de quelques protéines associées aux spores, on ne connaît absolument rien sur les différentes étapes de ce processus ni sur les protéines qui leur sont spécifiquement associées. Il a été juste montré que le facteur sigma K est essentiel à une sporulation efficace chez *C. difficile* [289] et que la protéine SleC est nécessaire à la germination et à la croissance de *C. difficile* en présence de taurocholate [290].

II.3.2. La tolérance au *p*-cresol

C. difficile jouit d'un avantage très sélectif lui permettant de persister dans le tractus gastro-intestinal. Il est, en effet, capable de produire un composé phénolique bactériostatique, le *p*-cresol, et il est surtout capable d'en tolérer des concentrations assez élevées. Il peut effectivement tolérer jusqu'à 0,4 % de *p*-cresol, une concentration largement au dessus du seuil de tolérance des autres clostridies et des autres bactéries testées [291]. Cette capacité de tolérance pour le *p*-cresol dépend toutefois des souches et elle s'avère plus élevée pour des souches dites « hypervirulentes » [292, 293]. La formation du *p*-cresol est induite par la fermentation de la tyrosine par la *p*-hydroxyphenylacetate decarboxylase (*p*-HPA) codée par les gènes *hpdBCA* (CD0153-CD0155 de la souche 630) [132, 294]. La sous-unité HpdC paraît être essentielle pour l'activité catalytique de l'enzyme et pour la régulation du système de décarboxylation [295].

II.3.3. La résistance aux peptides antimicrobiens

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. Ces facteurs sigma ont été appelés Csf pour *Clostridium Sigma Factors* (CsfT, CsfU et CsfV). Ils sont organisés en trois opérons avec, entre autres, leurs facteurs anti-sigma RsiT, RsiU et RsiV (figure 23). L'expression de ces facteurs sigma est induite par la présence de composés antimicrobiens, à savoir la bacitracine et le lysozyme. Une protéine homologue à la protéine PrsW de *B. subtilis* a été également identifiée chez *C. difficile*. PrsW catalyse normalement le premier site de clivage du facteur anti-sigma RsiW de *B. subtilis* et régule ainsi l'expression d'un de ses sept facteurs sigma ECF. Chez *C. difficile*, PrsW contrôle l'activation de CsfT en dégradant son anti-sigma RsiT et contrôle aussi indirectement l'activation de CsfU. Par l'intermédiaire de la voie de transduction de signal qu'elle régule, PrsW joue un rôle dans la résistance de *C. difficile* aux peptides antimicrobiens, ainsi que dans sa capacité de colonisation, à en juger par les résultats des études réalisées sur un mutant de PrsW [296].

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. A 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. Récemment, un locus nommé *cpr* (*Cationic Peptide Resistance*) a été identifié et associé à la résistance aux CAMPs. Ce locus comprend un cluster codant un système d'ABC transporteurs (*cprABC*) et un autre gène *cprK* codant une histidine kinase impliquée dans la régulation positive de l'expression de *cprABC*. Un autre gène situé juste en amont de *cprABC* (CD1348) et codant une lipoprotéine pourrait être également impliqué dans le mécanisme de fonctionnement du système Cpr (figure 24). Grâce à l'obtention de mutants résistants à la nisine et d'un mutant déficient en *cprA*, le rôle du système CprABC et de CprK dans l'acquisition d'une résistance à la nisine et à la gallidermine a été établi [297]. Un autre opéron *dlt* a été également associé à la résistance aux CAMPs, plus particulièrement à la nisine et la gallidermine, ainsi qu'à la polymyxine B et la vancomycine. L'opéron comprend quatre gènes *dltDABC* compris entre le gène CD2855 codant une oxydoréductase putative et le gène CD2850 codant un régulateur putatif qui pourrait être un répresseur des gènes *dltDABC*. Une séquence de 123 pb située entre CD2855 et *dltD* a été également identifiée sans connaître pour autant sa fonction réelle (figure 25). Le système agirait

par *d*-alanylation des acides teichoïques de la paroi cellulaire induisant une charge globale positive à la surface bactérienne et conduisant ainsi à la baisse d'efficacité des peptides antimicrobiens [298].

II.3.4. Srl : un nouveau facteur de virulence

Une équipe Japonaise a récemment identifié un nouveau facteur de virulence chez *C. difficile* qu'elle a dénommé Srl pour *Sensitivity Regulation of C. difficile Toxins* [299]. Il s'agit d'une protéine de 7,6 kDa comprenant, à son extrémité C-terminale, un motif *KDEL-like* (Lys-Asp-Glu-Leu). Chez certaines espèces bactériennes comme *E. coli* ou *Pseudomonas*, ce motif est impliqué dans la reconnaissance des récepteurs KDEL de l'hôte et dans le retro-transport des toxines de la région de Golgi au réticulum endoplasmique [300, 301]. Chez *C. difficile*, il a été démontré que Srl est capable d'induire la formation d'agrégats d'actine F et d'augmenter la cytotoxicité des toxines TcdA et TcdB, et ce en présence de l'une ou l'autre de ces toxines. La protéine Srl recombinante seule est en effet incapable d'induire le moindre effet cytotoxique sur des cellules en culture. Mais, en présence de TcdA ou TcdB, elle provoque l'agrégation de l'actine, un rétrécissement et un arrondissement des cellules plus importants, ainsi qu'une plus grande mortalité cellulaire par rapport aux toxines seules. Elle provoque également une plus forte désorganisation du cytosquelette. La protéine Srl semble être un facteur de virulence important puisqu'elle module la sensibilité des cellules épithéliales intestinales aux toxines TcdA et TcdB et elle augmente ainsi leur cytotoxicité. Elle est de plus présente dans plus de 80 % des souches de *C. difficile* [299].

III. Spécificités des souches dites « hypervirulentes »

Depuis 2003, les infections à *C. difficile* ont pris une dimension nouvelle avec l'apparition et la dissémination de nouvelles souches et plus particulièrement du clone NAPI/BI/027. Ce clone décrit comme « hypervirulent » a été responsable de plusieurs épidémies sévères et est devenu une bactérie redoutée en milieu hospitalier.

III.1. Souche épidémique NAP1/BI/027

III.1.1. Historique

La souche de *C. difficile* 027 a d'abord été détectée en 2003 au Canada et aux Etats-Unis où elle a été à l'origine de plusieurs épidémies [85, 302]. Puis, elle a diffusé dès 2003 en Europe. La première épidémie attribuée à la souche 027 en Europe a été décrite en 2003 à l'hôpital de Stoke Mandeville en Grande Bretagne avec 174 cas d'infection et 11 % de mortalité. La souche 027 a été ensuite décrite dans 16 pays européens. Parmi ces pays, neuf ont rapporté des épidémies liées à cette souche et 7 d'entre eux ont décrit des cas sporadiques [303]. Plus récemment, des cas d'ICD liés à la souche 027 ont été décrits en Australie et en Asie, plus particulièrement au Japon, en Corée et à Hong Kong [304-307].

En France, les premiers isolats de souche 027 ont été signalés en Mars 2006 dans un hôpital du nord de la France [308]. De Janvier 2006 à Décembre 2007, 64 établissements de santé du Nord Pas-de-Calais ont rapporté, par la suite, des cas sévères d'ICD liées à la souche 027. Une épidémie a été également signalée avec 281 cas d'ICD associées à cette souche. L'épidémie a pris fin vers la fin de l'année 2007, mais quelques cas sporadiques ont été identifiés jusqu'à fin 2009 [303, 309]. Hormis le Nord Pas-de-Calais, 118 établissements ont signalé un total de 347 cas d'ICD. Sept pour cent des souches isolées appartiennent au clone épidémique 027. Les souches 027 étaient isolées dans 5 établissements de 3 départements (Somme, Rhône et Moselle) [310]. De 2008 à 2009, 73 cas d'ICD ont été notifiés dont 29 cas ont été attribués de façon certaine à la souche 027 [309]. En 2009, 10 cas d'ICD ont été signalés cette fois dans la région parisienne. Les résultats de typage montrent que les patients ont été infectés par la souche

épidémique 027 et cela a été considéré comme une conséquence de l'épidémie du Nord de la France [309].

III.1.2. Evolution phylogénétique

Une étude phylogénétique, basée sur une analyse comparative de génomes de 75 souches d'origines différentes sur puces à ADN, montre que des souches hypervirulentes 027 représentent un groupe distinct parmi quatre groupes génétiquement différents de *C. difficile*. La différence génétique concerne surtout des gènes associés à la virulence et à l'adaptation à la niche écologique. Le génome des souches hypervirulentes montre, de plus, plusieurs délétions par rapport au génome de la souche 630, première souche séquencée. Seul 19,7 % des gènes sont communs aux différentes souches étudiées, ce qui suggère que cette bactérie subit facilement des échanges génétiques. Cette même étude a révélé une micro-évolution des souches hypervirulentes 027 à partir de la souche de PR 027 non épidémique CD196 et de la souche de PR 027 BI-1 en comparaison aux souches 027 récemment isolées [311]. Une autre étude phylogénétique réalisée par séquençage de 29 génomes de *C. difficile* montre une distribution fortement liée au PCR-ribotype. Des souches épidémiques de PR 017, 027 et 078 ont été également identifiées dans différents groupes contredisant ainsi l'idée de l'évolution de la virulence à partir d'un seul groupe. Dans cette étude, les auteurs soulignent également 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 hypervirulentes serait donc due, entre autres, aux effets génétiques. La pression de sélection et l'environnement interviendraient aussi fortement dans l'expansion de la virulence de *C. difficile* [312]. Malgré la variabilité du génome, les voies métaboliques sont particulièrement conservées sauf quelques unes, comme la voie de synthèse du tétrahydrofolate. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer la capacité d'adaptation de certaines souches hypervirulentes [313].

III.1.3. Spécificités génétiques des souches 027

Différentes études comparatives du génome des souches NAP1/BI/027 avec des souches historiques ont permis d'identifier plusieurs particularités génétiques. Une première étude a été

réalisée en comparant les 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) [254]. En résumé, les souches 027 possèdent 234 gènes uniques par rapport à la souche 630 dont 47 gènes uniques à la souche R20291 (annexe I) et 3 gènes uniques à la souche CD196 (figure 26). Parmi les principaux gènes variants entre les deux PR analysés, figurent des gènes de toxines, des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes flagellaires ou encore des gènes régulateurs qui peuvent avoir un rôle très important dans la survie de la bactérie. Les souches 027 présentent, en effet, des spécificités génétiques au niveau des gènes qui codent la toxine TcdB (variation de la région 3' qui code le domaine de liaison de la toxine à ses récepteurs cellulaires) et le répresseur TcdC (délétion de 18 pb et délétion d'une paire de base à la position 117). 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 grâce à 7 mutations localisées au niveau du gène de l'ADN gyrase. Elles ont aussi acquis deux transposons conjugatifs uniques dont l'un confère une résistance de niveau moyen au chloromphénicol. La souche 630 aurait, en revanche, deux copies de gènes de résistance à l'érythromycine portées par un transposon mobile Tn5398 et un gène de résistance à la tétracycline. Les souches 027 présentent aussi des différences au niveau des loci flagellaires. Le locus F1 des souches 027 partagerait 84 % à 90 % d'identité avec celui de la souche 630, en plus d'une région unique en amont du locus F1 qui serait responsable du processus de glycosylation des flagelles. Le locus F3 est commun mais la région inter-flagellaire F2 est complètement différente. Plusieurs gènes régulateurs seraient également différents. La différence la plus frappante est sans doute une deuxième copie du locus *agrCABD* (*accessory gene regulator*) dénommée *agr2*.

La comparaison des génomes des deux souches de PR 027 (dont l'une est épidémique et l'autre est non épidémique) a également révélé des différences génétiques. Il y aurait, en effet, au moins cinq régions génétiques uniques à la souche épidémique R20291. Ces gènes pourraient contribuer à la virulence de ce clone [254].

Une étude plus approfondie montre qu'en plus de l'acquisition ou de la perte de quelques gènes, des mutations ponctuelles ou des inversions pourraient affecter l'expression de certains gènes. Parmi les trois souches étudiées (630, R20291 et CD196), 39 séquences codantes seraient inactivées par une mutation dont quatre seraient spécifiques à la souche épidémique R20291 [314].

Une autre étude comparative réalisée sur 94 souches cliniques de PR différents (majoritairement isolées en Angleterre et aux Pays-Bas) montre que 17 des 537 sondes représentatives du PR 027 sur la puce sont retrouvées dans toutes les autres souches analysées. Le locus *agrCABD* a été par exemple identifié dans 86 % des souches analysées dont deux des quatre souches non toxigènes testées. Il ne serait donc pas lié au phénomène d'hypervirulence. Grâce à un nombre plus important de souches, il a été possible de vérifier l'existence de marqueurs génétiques associés à l'hypervirulence mais qui ne serait pas nécessairement associés de façon spécifique aux souches 027 [315].

D'autres études se sont plus particulièrement intéressées à des marqueurs génétiques d'hypervirulence pouvant être utilisés à des fins de diagnostic. Forgetta et coll. ont identifié, par analyse comparative de 14 génomes de souches associées à des infections sévères, 20 candidats de marqueurs génétiques et 10 683 polymorphismes à un seul nucléotide. Deux de ces gènes marqueurs (CD1269 et CD1265) ont été étroitement associés à des infections sévères à *C. difficile* [316]. Knetsch et coll. ont également identifié deux marqueurs génétiques d'hypervirulence chez *C. difficile* : CD01998-99 pour les souches 078 codant entre autres une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'antibiotiques et CD0043-46 pour les souches 027 codant une thymidylate synthétase ThyA catalytiquement plus efficace. Mais ces deux marqueurs sont également présents dans d'autres souches de PR différents. Ces souches sont phylogénétiquement proches à l'un ou l'autre des deux PR 027 et 078. Ceci ne permet pas de discriminer les souches d'un PR particulier, mais permet plutôt de faire un premier criblage de souches potentiellement hypervirulentes [317].

III.1.4. Particularité des toxines chez les souches 027

Typiquement, les souches NAP1/BI/027 produisent une toxine binaire et possèdent un gène de répression *tcdC* délété de 18 pb et d'une délétion ponctuelle à la position 117. Cette dernière délétion serait responsable d'un décalage du cadre de lecture et induirait la formation d'une protéine TcdC tronquée incapable d'assurer son rôle de répression sur les toxines TcdA et TcdB [216]. Certains auteurs ont proposé que ces délétions seraient à l'origine d'une augmentation de la production des toxines par les souches épidémiques 027 [84, 318-320]. Cette hypothèse a été, par la suite, contestée par Murray et coll. qui ont montré l'absence de corrélation entre le taux et la cinétique de production des toxines TcdA et TcdB par des souches cliniques NAPI-027 et entre la présence ou l'absence d'altérations dans les gènes *tcdC*, *tcdR* et *tcdE* [321]. L'étude de prévalence des délétions du gène *tcdC* dans des isolats cliniques montre également une grande prévalence de ces délétions dans différents PR de *C. difficile* autres que 027, ainsi que l'absence de lien entre ces délétions et le degré de sévérité des ICD [322, 323]. Par ailleurs, des travaux réalisés par Carter et coll. montrent que la mutation de *tcdC* dans la souche épidémique 027 (M7404) est un facteur important dans le développement de l'hypervirulence de cette souche dans la mesure où la complémentation de la mutation de TcdC réduit la virulence de la souche complétement par rapport à la souche sauvage. En revanche, ce facteur ne serait pas lié à la production de toxines proprement dite puisque les différentes souches testées produisent des quantités très variables de toxines [324].

Les souches épidémiques NAP1/BI/027 produisent-elles plus ou pas de toxines que les autres souches épidémiques ? La réponse à cette question reste encore imprécise. Malgré les hypothèses et les affirmations avancées par certaines équipes, d'autres infirment une surproduction de toxines par ces souches. Une analyse récente fondée sur une comparaison génomique a montré l'absence de corrélation entre production de toxines et le phénotype d'hypervirulence. Les souches non NAP1/BI/027 seraient capables de produire la même quantité de toxines voire plus par rapport aux souches NAP1/BI/027 [313].

En plus des délétions spécifiques au gène *tcdC*, les souches 027 présentent des variabilités de séquences dans le gène *tcdB* au niveau de son extrémité 3'. Ceci modifie le domaine de liaison C-terminal de la toxine TcdB aux cellules hôtes, et induit par conséquent des variations

fonctionnelles de son activité [325]. En comparaison à des souches de *C. difficile* historiques, la toxine TcdB de souches hypervirulentes présente une activité cytotoxique plus puissante sur des lignées cellulaires différentes [254]. Elle serait également plus toxique *in vivo* dans le modèle du poisson zèbre. La toxine TcdB de la souche hypervirulente (BI-17 6493) serait capable d'infiltrer les cellules hôtes plus rapidement et de transloquer précocement dans le cytosol par rapport à la souche historique VPI 10463 [326]. Elle aurait, de plus, une activité auto-protéolytique plus efficace [327].

Quant aux autres gènes du PaLoc (*tcdR*, *tcdE* et *tcdA*), la comparaison entre une souche 027 hypervirulente (R20291) et une autre souche non 027 non hypervirulente (630) montre environ 100 % d'identité et de similarité [326].

Les souches NAP1/BI/027 produisent également une toxine binaire, CDT, dont le rôle exact et l'implication éventuelle dans l'hypervirulence restent à déterminer. Il a été néanmoins montré que la toxine binaire pouvait augmenter le taux de colonisation par *C. difficile* en déclenchant la formation de protrusions microtubulaires à la surface des cellules épithéliales intestinales [278]. Elle serait également capable d'induire une forte réponse immunitaire chez des patients atteints d'ICD. Par ailleurs, une étude de prévalence de cette toxine parmi des isolats cliniques de *C. difficile* isolés entre 2008 et 2010 montre une grande prévalence de celle-ci (28 %) parmi différents PR dits hypervirulents ou non, ainsi que l'absence de corrélation entre la sévérité de l'infection et la détection de cette toxine [322].

III.1.5. Importance de la sporulation chez les souches 027

Un certain nombre d'études montrent que des souches épidémiques de *C. difficile* produisent plus de spores que des souches non épidémiques et cela contribuerait à la persistance et à la virulence de ces souches [328-330]. Une étude plus récente a montré des résultats contradictoires. Sur la base d'utilisation de deux techniques différentes de numération des spores et à partir d'un nombre d'échantillons plus important, les auteurs constatent que les souches épidémiques NAP1/BI/027 ne produisent pas plus de spores que les autres souches non épidémiques et que le phénomène de sporulation n'est pas du tout lié au type de souche [331, 332]. Ces auteurs soulignent les différentes méthodes d'analyse utilisées pour la détermination

du taux de sporulation et la divergence des protocoles. Ils suggèrent de standardiser les méthodes d'analyse en proposant une double analyse combinant une méthode de numération par culture et un comptage au microscope. Pour ces auteurs, il serait également judicieux de faire une étude cinétique du taux de sporulation au cours du temps. Finalement, ils proposent le recours à un contrôle négatif avec un mutant Spo0A incapable de sporuler [333]. Vu la divergence de ces résultats, d'autres études supplémentaires bien standardisées semblent nécessaires.

III.1.6. Autres particularités des souches 027

D'autres particularités pourraient expliquer l'hypervirulence des souches NAP1/BI/027. Ces souches sont en effet résistantes aux fluoroquinolones, en particulier à la moxifloxacine et à la gatifloxacine [302, 334-336]. Cette résistance est due à des mutations au niveau des gènes de l'ADN gyrase [337, 338].

Les souches de PR 027 possèdent également une séquence spécifique et conservée du gène de la S-layer (SLP). Cette séquence présente 89 % d'identité avec celle de la souche épidémique de PR 001 [339]. La sous-unité LMW de ces deux souches partagent, de plus, les mêmes propriétés immunogènes [340]. Ces résultats suggèrent l'implication des protéines SLPs dans le processus d'évasion des souches épidémiques à la réponse immunitaire de l'hôte. Il a été cependant démontré que les souches 027 et 001 n'induisent pas de réponse immunitaire plus importante que celle de la souche non épidémique 012 sur des modèles *ex vivo* de monocytes et de cellules dendritiques dérivées de monocytes [341].

Il est connu que *C. difficile* tolère des concentrations élevées de *p*-cresol, composé phénolique bactériostatique produit suite à la dégradation de la tyrosine. Dernièrement, il a été démontré que la souche hypervirulente 027 R20291 est capable de produire et de tolérer des concentrations encore plus importantes de *p*-cresol par rapport à la souche 630 et par rapport à la souche 027 non épidémique CD196. Cette propriété pourrait constituer un atout compétitif majeur pour ces souches au sein du microbiote intestinal [292, 293].

Un essai de mobilité réalisé par Stabler et coll. suggère aussi que la souche 027 R20291 est plus mobile que la souche 630 et qu'elle s'autoagglutine moins [254]. Ces observations n'ont pas été

approfondies. Cependant, vu l'importance de la mobilité et du processus de colonisation au cours d'une infection à *C. difficile*, il apparaît intéressant de comparer la capacité de la souche 027 à coloniser et à s'implanter dans le tractus digestif par rapport à une souche non épidémique. Les travaux réalisés dans cette thèse s'intéresseront donc en partie aux protéines flagellaires et à leur implication éventuelle dans l'hypervirulence de la souche 027.

III.2. Autres souches émergentes

Même si beaucoup d'intérêt a été porté à la souche NAP1/BI/027, d'autres souches de *C. difficile* ont également émergé et pourraient être aussi virulentes. Selon le lieu géographique, un PR peut être ou non prédominant. Par exemple, les souches de PR 053, 106, 001, 018 et 078 ont été respectivement considérées comme étant des souches dominantes en Australie (053), en Angleterre (106), en Allemagne (001) et en Italie (018, 078) [342-345]. Aux Pays-Bas, la prévalence des souches 078 a augmenté de 3 % à 13 % entre 2005 et 2008 [71]. En Corée, des épidémies dues aux souches de PR 017 ne produisant que la toxine TcdB ont été également rapportées [346, 347]. Une étude récente conduite dans 16 pays des trois continents américain, européen et australien, montre que la souche BI/027 est la souche la plus commune en Amérique du nord et que la souche de PR 001 est la souche la plus commune en Europe. La souche 027 ne représenterait en revanche que 8 % des souches identifiées en Europe [348]. Dans une autre étude réalisée dans 34 pays européens, la distribution des souches est plutôt différente. Parmi les 65 PR identifiés, les plus répandus sont les PR 014/020 (15.7 %), 001 (9.3 %) et 078 (7.8 %). La souche 027 ne représenterait que 5 % des souches identifiées [349]. Les souches 014 et 020 sont des souches très difficiles à différencier par PCR-ribotypage et c'est pourquoi elles sont la plupart du temps associées (014/020). Ces Souches 014/020 auraient un génome proche de celui de la souche 630 (90 % d'identité) et possèderaient les gènes supplémentaires des souches 027. Les gènes supplémentaires des souches 027 seraient en revanche retrouvés que dans la souche 020 (une seule souche a été comparée) [315]. Les souches 078 de toxinotype V quant à elles produisent les deux toxines TcdA et TcdB ainsi que la toxine binaire CDT et présentent une délétion de 39 pb ainsi qu'une mutation ponctuelle à la position 184 au niveau du gène *tcdC*. Ces souches ont été initialement identifiées chez les animaux plus particulièrement chez les porcs, veaux et porcelets, puis elles ont été identifiées chez l'homme [101, 350-352]. La

détection de souches 078 chez les animaux et chez l'homme et leur similarité génétique suggèrent la possibilité d'une transmission zoonotique [353-355]. Comparé aux patients infectés par les souches 027, les infections par les souches 078 touchent des personnes plus jeunes et sont plutôt acquises dans la communauté. Les infections par les deux types de souches présentent toutefois à peu près le même degré de sévérité et le même taux de mortalité [71].

Une étude récente souligne l'apparition de nouveaux types de souches (176, 198 et 244) très proches du PR 027 et qui auraient pu évoluer à partir de la lignée 027 [356]. Cette idée avait été suggérée par Knetsh et coll. vu les similitudes phénotypiques et phylogénétiques entre certaines souches de *C. difficile* et les souches 027 et 078 [317]. Si cette hypothèse s'avère vraie, il est possible que ces nouvelles souches soient aussi problématiques que les autres et elles devraient susciter autant d'intérêt et de vigilance.

TRAVAUX PERSONNELS

Objectifs scientifiques

Ces dernières années, nous avons assisté à l'émergence de nouvelles souches « hypervirulentes » et épidémiques de *C. difficile*, et plus particulièrement des souches de type NAP1/027 qui ont été responsables de plusieurs épidémies en Amérique du Nord et en Europe. Comprendre les raisons expliquant ce phénomène d'hypervirulence est donc devenu urgent et indispensable.

Comme la colonisation du tube digestif par *C. difficile* est considérée comme un pré-requis au développement de l'infection, il nous a paru logique d'étudier la capacité d'adhésion et de colonisation de la souche 027.

Nous nous sommes ainsi intéressés, en particulier, à la protéine de liaison à la fibronectine, FbpA, et à certaines protéines flagellaires. Pour cela des mutants d'inactivation, pour la plupart construits en collaboration avec l'Université de Nottingham, Royaume Uni, ont été étudiés pour leur pouvoir d'adhésion sur des cellules en culture et de colonisation dans différents modèles de souris. Des résultats assez inattendus nous ont, par la suite, mené à réaliser une étude plus approfondie de la protéine du flagelle FliC.

Une étude de la cinétique de colonisation *in vivo* de la souche 027 R20291, souche responsable d'épidémie à Stoke Mandeville en Angleterre, a été également réalisée en étroite collaboration avec l'équipe de Bruno Dupuy (Institut Pasteur Paris). Une approche globale, fondée sur l'analyse du transcriptome de *C. difficile*, nous a ainsi permis de mettre en évidence des gènes potentiellement importants lors des premières étapes de colonisation intestinale. Les protéines codées par ces gènes hautement régulés *in vivo* pourraient d'ailleurs être de très bonnes cibles pour la lutte contre ce pathogène.

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un projet européen HYPERDIFF (décembre 2008 - novembre 2011) dont l'objectif principal était la détermination des facteurs à l'origine de l'hypervirulence de *C. difficile* de type 027, et ce afin de mieux comprendre la physiopathologie des infections dues à cette souche et parvenir par la suite à la mise en place de mesures préventives et curatives adaptées.

La protéine de liaison à la fibronectine

I. Rôle de la protéine de liaison à la fibronectine, FbpA, dans le processus de colonisation de *C. difficile*

I.1. Introduction

Avant que la sécrétion des toxines responsables de l'altération de l'épithélium colique ait lieu, *C. difficile* doit persister dans le tractus gastro-intestinal, franchir la barrière du mucus et coloniser l'épithélium digestif. Ce processus d'adhésion et de colonisation implique l'intervention de plusieurs adhésines, de protéines flagellaires, ainsi que l'action d'enzymes protéolytiques. Parmi les adhésines décrites chez *C. difficile*, la protéine de liaison à la fibronectine, Fbp68, a été considérée comme une adhésine potentielle. Des anticorps dirigés contre la protéine inhibent partiellement l'adhésion de *C. difficile* aux cellules Vero en culture. Afin de confirmer le rôle de la protéine de liaison à la fibronectine, que nous nommerons par la suite FbpA (annotation proposée pour la souche 630), un mutant de FbpA a été construit dans la souche 630 Δ erm grâce à la technique du ClosTron. Le comportement du mutant a été par la suite comparé *in vitro* et *in vivo* à celui de la souche sauvage isogénique 630 Δ erm. Les multiples tentatives pour construire un mutant de FbpA dans la souche hypervirulente et épidémique 027 R20291 ont, malheureusement, échoué.

I.2. Article 1

ROLE OF FIBRONECTIN BINDING PROTEIN A IN *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INTESTINAL COLONIZATION

Amira Barketi-Klai, Sandra Hoys, Sylvie Lambert-Bordes, Anne Collignon, and Imad Kansau

Journal of Medical Microbiology (2011), **60**, 1155-1161

Présentation de l'article

Afin d'évaluer le rôle de la protéine de liaison à la fibronectine FbpA dans le processus de colonisation de *C. difficile*, deux mutants de FbpA ont été construits dans la souche 630 Δ erm à l'aide de la technique du ClosTron. Jusqu'à tout récemment, les manipulations génétiques sur le génome de *C. difficile* étaient très difficiles à réaliser. Grâce au développement du système ClosTron, la construction de mutants de gènes spécifiques est devenue possible permettant ainsi d'étudier le rôle de ces gènes et leur implication dans le processus de virulence. L'obtention des mutants de *C. difficile* n'est cependant pas facile et nécessite le passage par plusieurs étapes de clonages et de conjugaison. La technique, illustrée dans la figure 27, consiste en l'utilisation d'introns du groupe II qui sont des molécules d'ARN capables de s'exciser du transcrit initial et de cibler des copies de gènes sans intron, et ce grâce à des séquences particulières. Le changement de ces séquences (re-ciblage) permet de modifier la spécificité de la cible et d'orienter l'intron vers un gène particulier. Un changement au niveau de l'ORF à l'origine du pouvoir d'excision permet également d'empêcher une mobilité supplémentaire après que l'insertion désirée ait été achevée. Le re-ciblage est donc obtenu par génération d'un fragment de 350 pb par SOEing PCR (*Splycing by Overlap Extension PCR* = PCR particulière permettant de réaliser la réaction avec quatre amorces en un seul tube par un mécanisme d'extension avec chevauchements). Le clonage de ce fragment dans une souche d'*E. coli* via le plasmide pMTL007 permet par la suite son introduction chez *C. difficile* par conjugaison. La sélection des clones est enfin obtenue grâce à un marqueur de résistance à un antibiotique. Celui-ci est contenu dans l'intron de groupe II et il est lui-même interrompu par un intron de groupe I introduit dans un sens contraire. Le marqueur de résistance à l'antibiotique devient fonctionnel suite à

l'intégration de l'intron de groupe II au niveau du gène cible et suite à l'excision de l'intron de groupe I.

Deux mutants de FbpA dans la souche 630 Δ erm ont été ainsi obtenus. Ils ont été désignés Δ FbpA₁₃₇₀ et Δ FbpA₆₄₀ : les numéros 1370 et 640 réfèrent aux sites d'inactivation du gène. Une série de vérifications a permis de valider l'interruption du gène d'intérêt et l'arrêt de production de la protéine correspondante. Des analyses PCR ont permis de vérifier l'intégration correcte de l'intron de groupe II ainsi que celle du marqueur antibiotique au sein du gène *fbpA*, et de vérifier la perte du plasmide pMTL007 qui s'en est suivie. L'absence de production de protéine FbpA a été également vérifiée par Western blot. L'incapacité des mutants à adhérer à la fibronectine immobilisée a été aussi démontrée par tests immuno-enzymatiques de type ELISA.

Les deux mutants ont été par la suite caractérisés *in vitro* par évaluation de leur capacité d'adhésion à des cellules épithéliales humaines Caco-2 et à des cellules sécrétrices de mucus HT29-MTX en comparaison à celle de la souche sauvage 630 Δ erm. De manière surprenante, les deux mutants ont montré une capacité plus importante à adhérer aux cellules épithéliales, suggérant que l'absence de FbpA modifie les propriétés d'adhérence de *C. difficile*. Cette modification n'est cependant pas liée aux changements des propriétés hydrophobes de surface des deux mutants par rapport à celles de la souche sauvage, comme cela a été démontré par mesure de l'angle de contact entre l'eau et les biofilms bactériens et par estimation du degré d'affinité des cellules bactériennes à l'hexadécane. Afin d'expliquer cette forte adhésion cellulaire obtenue par les mutants Δ FbpA sur des cellules en culture, nous avançons l'hypothèse qu'une possible altération de la surface bactérienne puisse surexposer d'autres adhésines ou que la régulation d'une ou plusieurs autres protéines de surface ait été modifiée et ait provoqué une telle capacité d'adhésion.

Afin de mieux comprendre l'effet d'inactivation du gène *fbpA*, nous avons de plus étudié le comportement des souches mutantes dans un modèle animal mimant les conditions humaines. Pour cela, des essais *in vivo* ont été menés sur un modèle de souris gnotoxéniques en testant la souche mutante Δ FbpA₆₄₀ et la souche sauvage 630 Δ erm indépendamment (souris monoxéniques) et simultanément lors d'un essai de compétition (souris dixéniques). Le suivi de la cinétique d'implantation intestinale par ces souches a été déterminé par suivi de la

concentration bactérienne dans les fèces de souris. Leur capacité d'adhésion a été évaluée, sept jours après l'infection, par mesure de la densité bactérienne dans la muqueuse caecale. Testé seul, le mutant $\Delta FbpA_{640}$ présente une cinétique de colonisation semblable à celle de la souche sauvage, mais il aurait une capacité moindre à adhérer aux caeca de souris (à J7). En revanche, en essai de compétition le mutant montre une cinétique d'implantation intestinale plus faible comparée à celle de la souche sauvage, mais sans aucune différence au niveau de la muqueuse caecale. Le mutant $\Delta FbpA_{640}$ a été également analysé dans un modèle de souris à flore humaine après traitement antibiotique mais aucune différence n'a été observée entre les souches mutante et sauvage, vraisemblablement à cause de l'effet barrière exercé par le microbiote intestinal.

L'ensemble de ces résultats montre que FbpA joue bien un rôle dans le processus de colonisation de l'intestin par *C. difficile*, même si ce rôle semble ne pas être exclusif. Le phénomène d'adhésion et de colonisation est en effet un phénomène multifactoriel faisant intervenir plusieurs adhésines, en complément des protéines flagellaires et des enzymes hydrolytiques.

Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization

Amira Barketi-Klai, Sandra Hoys, Sylvie Lambert-Bordes, Anne Collignon and Imad Kansau

Correspondence

Imad Kansau

imad.kansau@u-psud.fr

EA 4043, USC INRA 'Ecosystème microbien digestif et santé', Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France

Clostridium difficile is a frequent cause of severe, recurrent, post-antibiotic diarrhoea and pseudomembranous colitis. Its pathogenicity is mediated mainly by two toxins, TcdA and TcdB. However, different adhesins have also been described as important colonization factors which are implicated in the first step of the intestinal infection. In this study, we focused our interest on one of these adhesins, fibronectin-binding protein A (FbpA), and on its role in the intestinal colonization process. A mutant of FbpA (CD Δ FbpA) was constructed in *C. difficile* strain 630 Δ erm by using ClosTron technology. This mutant was characterized *in vitro* and *in vivo* and compared to the isogenic wild-type strain. Adhesion of the CD Δ FbpA mutant to the human colonic epithelial cell line Caco-2 and to mucus-secreting HT29-MTX cells was examined. Surprisingly, the CD Δ FbpA mutant adhered more than the wild-type parental strain. The CD Δ FbpA mutant was also analysed in three different mouse models by following the intestinal implantation kinetics (faecal shedding) and caecal colonization (7 days post-challenge). We showed that in monoxenic mice, CD Δ FbpA shed *C. difficile* in faeces at the same rate as that of the isogenic wild-type strain but its colonization of the caecal wall was significantly reduced. In dixenic mice, the shedding rate was slower for the CD Δ FbpA mutant than for the isogenic wild-type strain during the first days of infection, but no significant difference was observed in caecal colonization. Similar rates of intestinal implantation and caecal colonization were observed for both strains in assays performed in human microbiota-associated mice. Taken together, our data suggest that FbpA plays a role in intestinal colonization by *C. difficile*.

Received 24 December 2010

Accepted 21 February 2011

INTRODUCTION

Clostridium difficile is an emerging nosocomial pathogen of increasing importance and virulence, especially with the appearance of hypervirulent strains in the last few years. It is the major cause of pseudomembranous colitis and causes 15–20% of antibiotic-associated diarrhoea cases associated with the use of antibiotic treatment (Cartman *et al.*, 2010; Poxton *et al.*, 2001). Antibiotics disrupt the normal intestinal microbiota, allowing *C. difficile* to colonize the gut. The pathogenesis of *C. difficile* infections has been attributed to two toxins, TcdA and TcdB, which act as glycosyltransferases and modify small GTPases of the Rho protein family within the host cell, resulting in alterations in the cytoskeleton (Genth *et al.*, 2008; Voth & Ballard, 2005). Apart from these two toxins, a binary toxin is also produced by a few strains but little is known about the other virulence factors which are involved in the colonization process. Presently, only a few cell surface proteins have been identified and characterized. These proteins include the S-layer proteins (Calabi *et al.*, 2002; Cerquetti *et al.*, 2000), the flagellum and its components (Tasteyre *et al.*, 2001), the cell wall protein Cwp66 (Waligora *et al.*, 2001),

the protease Cwp84 (Janoir *et al.*, 2007) and the heat-shock protein GroEL (Hennequin *et al.*, 2001). This study focuses on one of the adhesive proteins, the fibronectin-binding protein (annotated FbpA in the 630 strain and Fbp68 in the 79-685 strain) (Hennequin *et al.*, 2001).

Fibronectin is a dimeric glycoprotein (~440 kDa) which is present in a soluble form in plasma and in an immobilized form on cell surfaces and in extracellular matrix (Joh *et al.*, 1999). It is an important target for bacterial attachment in many pathogens, such as *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* and *Listeria monocytogenes*, where fibronectin-binding proteins are important virulence factors (Courtney *et al.*, 1999; Dramsi *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2001; Molinari *et al.*, 1997; Terao *et al.*, 2001). In a previous study, a fibronectin-binding protein, Fbp68 from *C. difficile* strain 79-685, was identified as one of its several adhesins. It was reported that Fbp68 is able to adhere to soluble and to immobilized fibronectin, as well as to fibrinogen. Competitive adherence inhibition assays have shown that antibodies raised against Fbp68 partially inhibit the attachment of *C. difficile* to fibronectin and Vero cells (Hennequin *et al.*, 2003).

Thanks to the new Clostron gene knockout system which has been successfully developed by Heap *et al.* (2007), we constructed a mutant in the *fbpA* gene. The mutant was characterized *in vitro* and *in vivo* and compared to the isogenic wild-type strain in order to further understand the role of fibronectin-binding protein FbpA in the pathogenesis of *C. difficile*.

METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The *C. difficile* 630Δerm strain and the CDΔFbpA mutants generated in 630Δerm were grown in brain–heart infusion (BHI) broth and in Columbia cysteine agar supplemented with 0.4% *C. difficile* selective supplements (Oxoid) and 4% horse blood (CC) at 37 °C under anaerobic conditions. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) was used for gene cloning and *E. coli* HB101 RP4 was used for conjugation. Both strains were grown in Luria–Bertani medium under agitation at 37 °C. Kanamycin and ampicillin were used for *E. coli* at 25 and 100 µg ml⁻¹, respectively.

Construction of the *C. difficile* ΔFbpA mutant. The Clostron gene insertional knockout system was used for the construction of the CDΔFbpA mutant (Heap *et al.*, 2007). Different insertion sites within the *fbpA* gene were identified using the Targetron Design Site program (<http://www.sigma-genosys.com/targetron>). Two different antisense sites were chosen (640 bp and 1370 bp from the start codon). A 350 bp fragment was generated by SOEing PCR with primers designed by inputting the targeted sequence into the web-based program (Table 1). The PCR product was excised and purified from a 1% agarose gel. It was then cloned into pMTL007 via *Hind*III and *Bsr*GI and transformed into *E. coli* TOP10. Sequence confirmation of purified plasmid constructs was performed using specific pMTL007 primers (Table 1). The derivative pMTL007 plasmid construct was transformed by electroporation into the conjugative donor *E. coli* HB101 RP4 and transferred by conjugation into *C. difficile* 630Δerm. Successful transconjugants were selected onto CC medium supplemented with 15 µg thiamphenicol ml⁻¹. The thiamphenicol-resistant colonies were then restreaked onto CC medium supplemented with 5 µg erythromycin ml⁻¹ to select for the presence of spliced ErmRAM, which indicates intron integration. The obtained integrants were screened by colony PCR using primers specific for *fbpA* and the inserted RAM

(retrotransposition-activated marker) (Table 1). Sequencing of these PCR products allowed us to confirm the insertion in the targeted gene.

Western blot analysis. *C. difficile* was grown overnight in BHI broth and washed twice with PBS. The pellet was resuspended in Tris/HCl (62 mmol l⁻¹; pH 6.8) supplemented with 60 µg mutanolysin ml⁻¹ and incubated at 37 °C for 1 h 30 min. The suspension was then mixed for 5 min. Protein extracts were separated by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to Hybond-P membranes (GE Healthcare). After blocking with BSA, the blot was incubated with a 1/10 000 dilution of an anti-FbpA polyclonal antibody (Hennequin *et al.*, 2003), followed by incubation with an anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma; 1/20 000). The blot was then washed and reacted with the substrate solution BCIP/NBT (Sigma).

Immobilized fibronectin-binding assay. Binding of *C. difficile* to immobilized human fibronectin (Sigma) on microtitre plates (Nunc) was measured as described previously (Hennequin *et al.*, 2003). In brief, wells were coated overnight at 4 °C and for 1 h at 37 °C with 10 µg fibronectin ml⁻¹. After blocking with 1% BSA in PBS for 2 h, the plates were incubated for 30 min with 100 µl of various concentrations of a late stationary phase *C. difficile* culture. After washing five times with PBS, the bound bacteria were detected using an anti-*C. difficile* polyclonal antibody diluted to 1/2500. Antibodies were then detected by alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma; 1/2500) and by *p*-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma). The resulting colour development was measured at A₅₉₅.

Adhesion to Caco-2 and HT29 cell lines. *In vitro* adhesion of *C. difficile* was studied on human colonic enterocyte-like Caco-2 cells (passage 71) and on mucus-secreting HT29-MTX cells (passage 45) in culture. Epithelial cells were cultured in 24-well plates in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% (v/v) non-essential amino acids (only for Caco-2 cells) and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. The culture medium was changed daily. Differentiated monolayers were used 15 days (Caco-2) and 21 days (HT29-MTX) after seeding. Overnight cultures of *C. difficile* were pelleted, washed and resuspended in DMEM without fetal bovine serum and without non-essential amino acids. After counting in a Salubini chamber, the bacterial culture was adjusted to 10⁸ bacteria ml⁻¹. The real density of the inoculum was determined subsequently from viable c.f.u. counts. Bacterial suspension (0.5 ml) was added to each well and plates were then incubated for 1 h 30 min at 37 °C under

Table 1. Primers used in this study for mutant generation

Primer	Sequence (5'→3')
IBS ₆₄₀	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACTGCTCTGTAGCGTGCGCCAGATAGGGTG
EBS1d ₆₄₀	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTGTAGCAATAACTTACCTTTTCGT
EBS2 ₆₄₀	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTAGCAGTCGATAGAGGAAAGTGCT
IBS ₁₃₇₀	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGTATCCTTTTTAGTGCGCCAGATAGGGTG
EBS1d ₁₃₇₀	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTTTTACTTAACCTTACCTTTCTGT
EBS2 ₁₃₇₀	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTGATACTCGATAGAGGAAAGTGCT
EBSu	CGAAATTAGAACTTGCCTTCAGTAAAC
FbpA ₆₄₀ -F	TTCATTGCCACCAGAACAAA
FbpA ₆₄₀ -R	AGAAATCTCCAGAATACGAGACA
FbpA ₁₃₇₀ -F	CACCATCTGAAAATGCTCAAAA
FbpA ₁₃₇₀ -R	GGGACTTCCTTACCAGCACA
ErmRAM-F	ACGCGTTATATTGATAAAAAATAATAATAGTGGG
ErmRAM-R	ACGCGTGC GACTCATAGCCTTATTTCTCCCG

anaerobic conditions. The non-adherent bacteria were removed by washing five times with PBS and the bound bacteria were detached by adding 0.5 ml 1% saponin per well. Serial dilutions were plated on BHI agar plates and c.f.u. were counted after 48 h of incubation. For each plate, three wells were used to count the number of cultured cells in order to express the results as c.f.u. per cell. Briefly, cells were treated with 200 μ l trypsin for 10 min and 300 μ l DMEM was added. Cells were scraped and homogenized for subsequent enumeration.

The assays were done in triplicate in three independent experiments. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test with StatEL software. All conclusions were based on $P < 0.05$ as significant.

Measurement of bacterial hydrophobicity

Contact angle measurements. Contact angle measurements were carried out using a G1/G40 (Krüss) goniometer coupled to the Drop Shape Analysis DSAv1.80 software. One hundred and twenty microliters of a bacterial suspension (2×10^{10} bacteria ml^{-1} in 0.15 M PBS) was deposited on a microscope slide and then left to dry for 2 h at 37 °C. The homogeneity of the bacterial film was checked by differential interference contrast microscopy using a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 510) with a Plan-Apochromat $\times 63/1.40$ oil objective. Drops of ultrapure water were deposited onto the surface and the contact angle was measured immediately after their deposition onto the bacterial film. The values obtained were mean contact angles from three different experiments with three independently grown cultures. For each strain and each experiment, at least eight different drops were measured.

Bacterial adherence to hexadecane. Adherence to hexadecane was tested by the method of Bellon-Fontaine *et al.* (1996). The washed bacterial pellet was diluted in 0.15 M PBS to a concentration of about 10^8 bacteria ml^{-1} . The A_{405} of this suspension (A_0) was measured using a spectrophotometer (Ultraspec 1000; Amersham Pharmacia Biotech). Each bacterial suspension (2.4 ml) was vortexed for 90 s with 0.4 ml *n*-hexadecane (Sigma). The mixture was allowed to stand for 15 min to ensure complete separation of the two phases. The absorbance of the water phase was then measured (A). The percentage bacterial adherence to hexadecane was subsequently calculated by the following equation: % adherence = $(1 - A/A_0) \times 100$, where A_0 is the A_{405} of the bacterial suspension before mixing and A is the absorbance after mixing. Each experiment was carried out five times with bacteria originating from independent cultures. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test with StatEL software. All conclusions were based on $P < 0.05$ as significant.

In vivo experiments. C3H/HeN germ-free and human microbiota-associated mice from INRA of Jouy-en-Josas (ANAXEM, France) were used. To prepare *C. difficile* for challenge, *C. difficile* was grown in BHI broth at 37 °C in an anaerobic chamber overnight. Bacteria were harvested by centrifugation, suspended in PBS and diluted to 2×10^7 cells ml^{-1} after counting with a Salubini chamber. The real density was determined subsequently from viable c.f.u. counts. Groups of 6-week-old male mice ($n=6$) were orally challenged with 0.5 ml bacterial suspension and monitored for up to 7 days. Faecal samples were collected every day from each mouse. They were weighed and diluted in PBS in order to obtain a concentration of 10 mg ml^{-1} . The number of bacteria present in faeces was determined by using serial dilutions in PBS and by seeding them on BHI agar. Seven days after *C. difficile* challenge, mice were sacrificed and dissected in order to obtain the entire caecum of each mouse. Each caecum was washed eight times by gentle shaking in PBS buffer, weighed and placed in PBS to a final concentration of 10 mg ml^{-1} . The caecum was then homogenized with an Ultra-Turrax apparatus (IKA-Labortechnik) for 1 min at 13 500 r.p.m. Serial dilutions were seeded and cultured in appropriate media.

Competition experiments were performed by co-infecting the same animal with equal amounts of wild-type and mutant strains. The amount of each bacterium in faeces was obtained by plating on selective plates, according to the erythromycin resistance of the CD Δ FbpA mutant. Experiments on human microbiota-associated mice were performed 2 days after antibiotic treatment. Mice were treated with 3 mg amoxicillin/clavulanic acid (8/1, v/v) (Augmentin; Teva Classics) for 8 days by intragastric gavage. The amount of *C. difficile* in faeces was obtained by plating on *C. difficile* selective plates (CC).

RESULTS AND DISCUSSION

C. difficile Δ FbpA mutant does not express FbpA and does not bind fibronectin

The *C. difficile* Δ FbpA mutant was constructed by ClosTron technology. This technique consists of retargeting the mobile group II intron from the *ltrB* gene of *Lactococcus lactis* (L1.ltrB), which provides stable insertional inactivation of specific genes and which confers erythromycin resistance via a retrotransposition-activated marker. Two different mutants were obtained in the *fbpA* gene with two different insertion sites, 640 bp (CD Δ FbpA₆₄₀) and 1370 bp (CD Δ FbpA₁₃₇₀). Disruption of *fbpA* was confirmed by PCR and by direct sequencing of the junction points. Western blot analysis confirmed that the two mutants did not express FbpA (Fig. 1). It should be noted that FbpA migrates faster (at about 35 kDa) than expected (68 kDa) in a denaturing gel. It was previously observed that native Fbp68 of the *C. difficile* 79-685 strain had an aberrant migration on SDS-PAGE (Hennequin *et al.*, 2003). This could be explained either by an unusual conformation of the full-length protein or by another post-translational processing of the native FbpA in *C. difficile*. Analysis of the fibronectin-binding properties of the

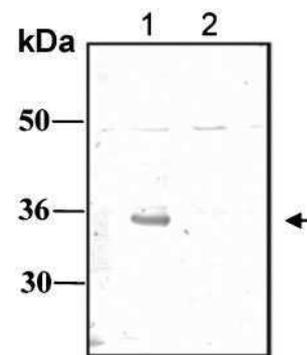


Fig. 1. Lack of FbpA expression by the CD Δ FbpA₆₄₀ mutant in Western blot analysis. Whole proteins extracted from cultures (10 ml) of CD630 Δ erm (lane 1) and CD Δ FbpA₆₄₀ (lane 2) were subjected to SDS-PAGE, transferred to Hybond-P membrane and then probed with 1/10 000 anti-FbpA polyclonal antibodies. The arrow indicates the location of FbpA, which is present in CD630 Δ erm but not in CD Δ FbpA₆₄₀. The same result was obtained for CD Δ FbpA₁₃₇₀.

mutants compared to those of the wild-type strain showed that both mutants were not able to bind fibronectin immobilized on immunoplates (Fig. 2). These results show that the *fbpA* gene was really inactivated and that the FbpA protein was no longer expressed in the two mutants. CDΔFbpA mutants showed the same colony aspect and growth rate as the isogenic wild-type strain (data not shown).

Absence of FbpA affects adhesion of *C. difficile* to intestinal epithelial cells

In order to elucidate whether FbpA plays a role in the colonization process, which is the first step in the course of infection, CDΔFbpA₆₄₀ and CDΔFbpA₁₃₇₀ mutants were analysed for their ability to adhere to cultured intestinal epithelial cells. Only the results obtained with the CDΔFbpA₆₄₀ mutant are presented. First, we measured adhesion of the CDΔFbpA mutants to Caco-2 cells. Surprisingly, a small but significant increase in adhesion was observed for the mutants (1.17 c.f.u. per cell for CDΔFbpA₆₄₀) as compared to the wild-type strain (5.47×10^{-2} c.f.u. per cell) ($P < 0.05$). The CDΔFbpA₆₄₀ mutant also adhered slightly more (2.6 c.f.u. per cell) than the wild-type strain (3.15×10^{-2} c.f.u. per cell) onto HT29-MTX cells ($P < 0.05$). The same results were obtained with the two CDΔFbpA mutants (data not shown for the CDΔFbpA₁₃₇₀ mutant). These striking results suggest that the absence of FbpA leads to some changes in the adhesion properties of *C. difficile*. One hypothesis is that there could be changes in the hydrophobic properties of the bacterial surface. In order to test this hypothesis, we performed measurements of the contact angle between water drops and bacterial films as well as tested adherence to hexadecane for the two CDΔFbpA mutants and the

wild-type strain. Using these two techniques we did not observe any significant difference between strain 630Δerm, CDΔFbpA₆₄₀ and CDΔFbpA₁₃₇₀ (Fig. 3a, c; data not shown for the CDΔFbpA₁₃₇₀ mutant). Microscopic analysis (differential interference contrast microscopy) of the bacterial films used for contact angle measurements showed a flat, regular and homogeneous surface for all the tested biofilms (Fig. 3b). These results suggest that hydrophobic properties are not involved in the increased adhesion of CDΔFbpA mutants to intestinal epithelial cells. The observed increased adherence of these mutants could also be explained by changes in the bacterial surface other than hydrophobicity which lead to an overexposure of other adhesins. Another hypothesis could be changes in the regulation of one or more of the cell wall proteins. Further experiments should be performed in order to confirm these hypotheses. In a previous study, it has already been reported that a ΔFbpA mutant in *Lactobacillus casei* adhered more than the wild-type strain to the HT29-MTX cell line whereas no significant changes were detected in the ability to bind to Caco-2 (Muñoz-Provencio *et al.*, 2010). It was speculated that *L. casei* probably utilizes other FbpA-independent mechanisms for attachment to the HT29 and Caco-2 cell lines or that the contribution of FbpA to binding in these models is small. In another recent report, a CDΔFbp68 mutant was constructed in *C. difficile* 630 (insertion site at 102 bp) by using the same ClosTron gene knockout system (Lin *et al.*, 2011). The authors assayed adherence to Caco-2 cells and showed that their mutant had similar fibronectin- and cell-binding activities to the wild-type strain. Contrary to their results, our CDΔFbpA mutants did not adhere to human fibronectin by comparison with the wild-type CD630Δerm strain. Moreover, adherence of the mutants to cultured cells was tested on two different cell lines, which showed that the CDΔFbpA mutants adhere slightly more to both Caco-2 cells and mucus-secreting HT29-MTX cells. It is possible that the different genetic background of the mutated bacteria plays a role in the differences observed in the adherence properties.

Still in order to determine the role of FbpA and the implication of its adhesive properties in the colonization of *C. difficile*, we tested the capacity of the CDΔFbpA₆₄₀ mutant to colonize the intestine of mice.

FbpA plays a role in intestinal colonization of mice

In order to assess the capacity of the CDΔFbpA₆₄₀ mutant to colonize mice, the kinetics of faecal shedding and caecal colonization were studied in three different mouse models. Kinetics of faecal shedding allows measurement of the intestinal implantation of a strain, while caecal colonization allows evaluation of the capacity of one strain to interact with the intestinal epithelium. For each experiment, faeces were collected at specific times during a week and caeca were obtained by sacrificing mice 7 days post-challenge.

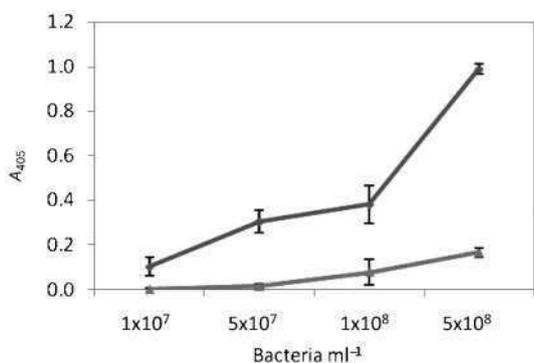


Fig. 2. Binding of the wild-type strain CD630Δerm (◆) and the CDΔFbpA₆₄₀ mutant (▲) to immobilized human fibronectin. Various concentrations of CD630Δerm or CDΔFbpA₆₄₀ were added to fibronectin (10 μg ml⁻¹)-coated wells. Binding was measured by ELISA using an anti-*C. difficile* polyclonal antibody and an alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit secondary antibody. The A₄₀₅ was measured. The same result was obtained for CDΔFbpA₁₃₇₀.

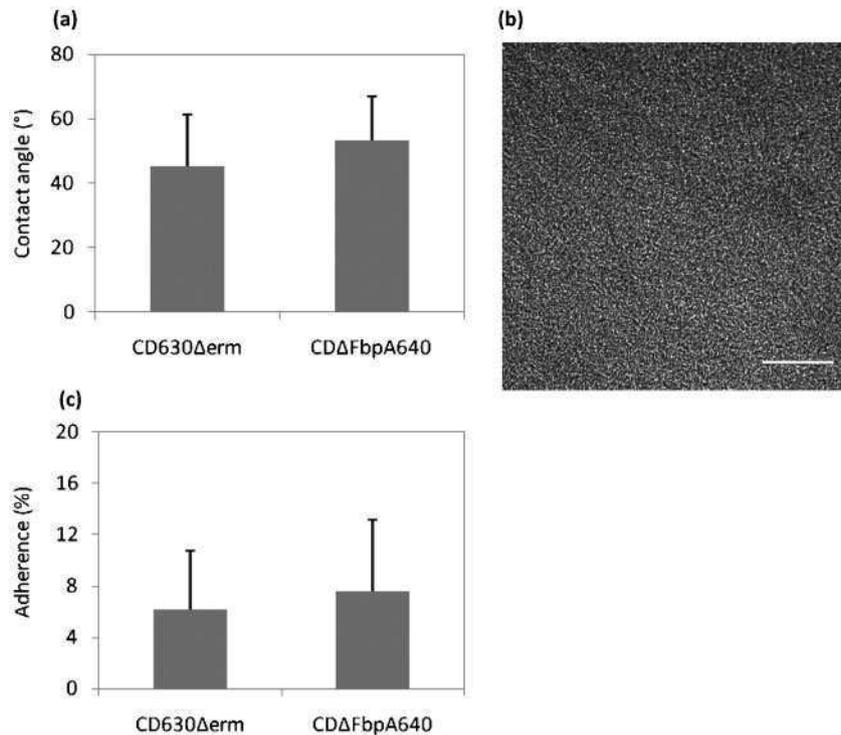


Fig. 3. Hydrophobicity of the wild-type strain CD630Δerm and the CDΔFbpA₆₄₀ mutant. (a) Contact angle measurements. One hundred and twenty microlitres of a bacterial suspension (2×10^{10} bacteria ml^{-1}) was deposited on a microscope slide and then left to dry. Contact angles were measured immediately after the deposition of drops of water onto the bacterial film. The reported values are the mean contact angles from three independent experiments. (b) Differential interference contrast microscopy image of a representative bacterial film showing a homogeneous and continuous covering of the slide. Bar, 30 μm . (c) Bacterial adherence to *n*-hexadecane. Each bacterial suspension (2.4 ml; 10^8 bacteria ml^{-1}) was mixed with 0.4 ml *n*-hexadecane and vortexed for 90 min. The mixture was allowed to stand for 15 min. The percentage of adherence to *n*-hexadecane was calculated by using the initial A_{405} of the bacterial suspension and the absorbance of the water phase after mixing as indicated in Methods. The bars represent standard deviation of five independent experiments.

Monoxenic mice. In this model, mice were challenged with either the *fbpA* mutant or the wild-type strain. The same faecal shedding kinetics was observed for the two strains (Fig. 4). The rate of faecal shedding increased during the first hours of infection, reached a plateau after about 8 h and then remained constant. Even though the faecal shedding kinetics of the *fbpA* mutant was no different from that of the wild-type strain, a significant decrease in caecal colonization was noted [2.51×10^6 c.f.u. (g caeca)⁻¹ and 7.88×10^5 c.f.u. (g caeca)⁻¹ for the wild-type strain and CDΔFbpA₆₄₀ mutant, respectively; $P < 0.05$]. This reduced caecal colonization suggests a role for FbpA in adherence and in intestinal colonization.

Dixenic mice. We carried out a competition assay in which mice were simultaneously challenged with both the CDΔFbpA₆₄₀ mutant and the wild-type strain. The CDΔFbpA₆₄₀ mutant and CD630Δerm showed two different kinetics (Fig. 5). In fact, the mutant shed less *C. difficile* than the wild-type strain during the first 5 days

after challenge. We particularly observed a significant and important reduction of the shedding rate at 48 h, 72 h and 96 h post-challenge for the CDΔFbpA₆₄₀ mutant. After 120 h post-challenge, the shedding rate became similar for the two strains. Even though a lower rate of caecal colonization was observed for the CDΔFbpA₆₄₀ mutant in this model, this difference was not statistically significant. These results as well as those observed in monoxenic mice support the fact that FbpA plays a role in intestinal colonization of mice.

Human microbiota-associated mice. We also tested the capacity of the CDΔFbpA₆₄₀ mutant to colonize the gut and adhere to the caeca of human microbiota-associated mice. Wild-type and CDΔFbpA₆₄₀ mutant strains colonized at exactly the same rate (Fig. 6). The absence of difference in this model is not so surprising and could be explained by the barrier effect of the intestinal microbiota. Moreover, the colonization process is multifactorial and probably involves several adhesins. Consequently, the effect of only one adhesin is difficult to observe in such a model.

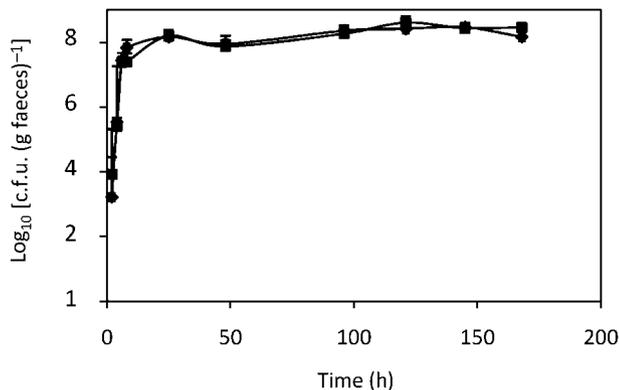


Fig. 4. Role of FbpA in intestinal colonization of monoxenic mice by *C. difficile*. Kinetics of intestinal implantation by wild-type strain CD630 Δ erm (\blacklozenge) and the CD Δ FbpA₆₄₀ mutant (\blacksquare). Mice were challenged ($n=6$) with a total of 5×10^8 bacteria per mouse of each of the two strains. Faeces were collected and treated daily for a week to obtain the number of c.f.u. (g faeces)⁻¹.

C. difficile pathogenicity is mainly mediated by its two toxins, TcdA and TcdB, but other factors undoubtedly contribute to its virulence, particularly in the initial colonization process. This first step occurs before the production of toxins and involves several adhesins. Thus, it is very important to study the precise role of these adhesins in the colonization process. FbpA represents one of these adhesins. It has already been reported that FbpA is able to bind to soluble and to immobilized fibronectin and that it is probably implicated in cell adherence. These conclusions are based on a competitive inhibition assay using anti-Fbp antibodies and on an adherence assay of Fbp to radiolabelled Vero cells which carry fibronectin on their

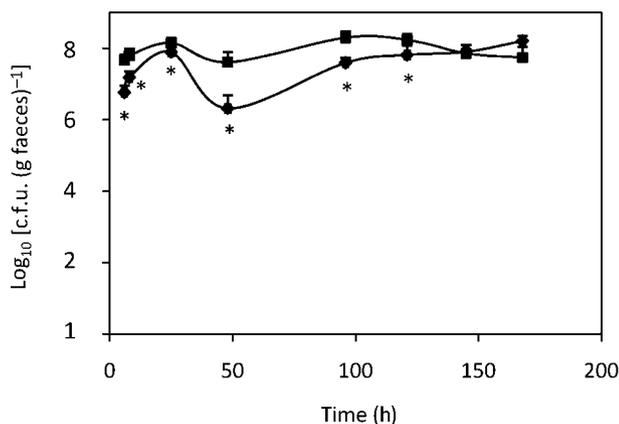


Fig. 5. Role of FbpA in intestinal colonization of dixenic mice by *C. difficile*. Kinetics of intestinal implantation by wild-type strain CD630 Δ erm (\blacksquare) and the CD Δ FbpA₆₄₀ mutant (\blacklozenge). The same protocol as described for monoxenic mice was used but mice were co-infected with the two strains. Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated by *.

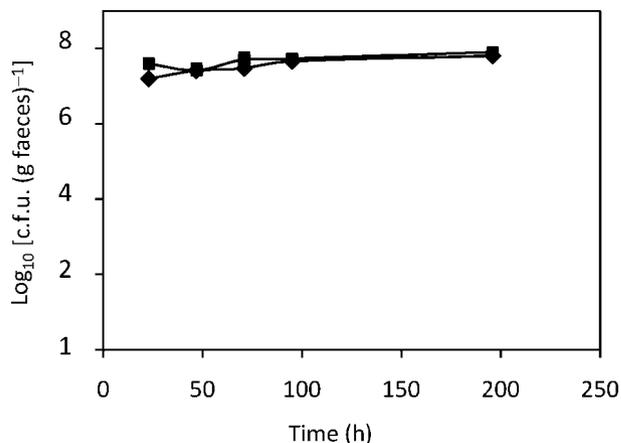


Fig. 6. Role of FbpA in colonization of human microbiota-associated mice by *C. difficile*. Kinetics of intestinal implantation by wild-type strain CD630 Δ erm (\blacklozenge) and by the CD Δ FbpA₆₄₀ mutant (\blacksquare). Human microbiota-associated mice ($n=6$) were inoculated with each of the two strains and the kinetics of colonization was followed by analysing faecal shedding over time. Results are expressed as number of colonies obtained (g faeces)⁻¹.

surface (Hennequin *et al.*, 2003). In our study, we tried to confirm the role of FbpA in cell adherence and to elucidate the role of FbpA in the initial *C. difficile* colonization process in particular. For this purpose, we constructed a CD Δ FbpA knockout mutant and studied the effect of this mutation *in vitro* on cultured epithelial cells and also *in vivo* using different mouse models. We demonstrated that mutation in the *fbpA* gene affects the adherence of *C. difficile* 630 Δ erm to epithelial cell lines and that adherence is increased. Both caecal colonization (in monoxenic mice) and intestinal implantation (in dixenic mice) of the CD Δ FbpA mutant are slower than those of the wild-type strain. Taken together, these data suggest a role for FbpA in intestinal colonization by *C. difficile*. This role is minor but not insignificant and is probably shared with other adhesins. This strengthens the idea that intestinal colonization is a complicated process which involves several colonization factors. The observed effect might also be different between strains. Thus, it could be interesting to test the effect of FbpA mutation on other strains, especially hypervirulent strains such as the NAP1/027 strain.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Collaborative Project HYPERDIFF, 'The Physiological Basis of Hypervirulence in *Clostridium difficile*: a Prerequisite for Effective Infection Control', grant agreement no. 223585. We would like to thank Nigel Minton and John Heap, University of Nottingham, UK, who developed the ClosTron gene knockout system, for supplying us with the pMTL007 plasmid, as well as Bruno Dupuy, Institut Pasteur, France, for supplying us with the *C. difficile* 630 Δ erm strain. We also thank Catherine Ringard-Lefebvre and Véronique Rosilio, Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces, UMR CNRS 8612, University Paris-Sud

11, Châtenay-Malabry, France, for their help in doing contact angle measurements, and Valérie Nicolas, IFR141 Plateforme Imagerie, University Paris-Sud 11, France, for dealing with the confocal microscopy.

REFERENCES

- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **7**, 47–53.
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A. D. & Fairweather, N. F. (2002). Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* **70**, 5770–5778.
- Cartman, S. T., Heap, J. T., Kuehne, S. A., Cockayne, A. & Minton, N. P. (2010). The emergence of ‘hypervirulence’ in *Clostridium difficile*. *Int J Med Microbiol* **300**, 387–395.
- Cerquetti, M., Molinari, A., Sebastianelli, A., Diociaiuti, M., Petruzzelli, R., Capo, C. & Mastrantonio, P. (2000). Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates. *Microb Pathog* **28**, 363–372.
- Courtney, H. S., Hasty, D. L., Li, Y., Chiang, H. C., Thacker, J. L. & Dale, J. B. (1999). Serum opacity factor is a major fibronectin-binding protein and a virulence determinant of M type 2 *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **32**, 89–98.
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H. & Cossart, P. (2004). FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* **53**, 639–649.
- Genth, H., Dreger, S. C., Huelsenbeck, J. & Just, I. (2008). *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 592–597.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P. & Minton, N. P. (2007). The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods* **70**, 452–464.
- Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P. & Karjalainen, T. (2001). GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* **147**, 87–96.
- Hennequin, C., Janoir, C., Barc, M. C., Collignon, A. & Karjalainen, T. (2003). Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* **149**, 2779–2787.
- Holmes, A. R., McNab, R., Millsap, K. W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J. L. & Jenkinson, H. F. (2001). The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* **41**, 1395–1408.
- Janoir, C., Péchiné, S., Grosdidier, C. & Collignon, A. (2007). Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol* **189**, 7174–7180.
- Joh, D., Wann, E. R., Kreikemeyer, B., Speziale, P. & Höök, M. (1999). Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* **18**, 211–223.
- Lin, Y. P., Kuo, C. J., Koleci, X., McDonough, S. P. & Chang, Y. F. (2011). Manganese binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and is essential for fibronectin binding. *J Biol Chem* **286**, 3957–3969.
- Molinari, G., Talay, S. R., Valentin-Weigand, P., Rohde, M. & Chhatwal, G. S. (1997). The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* **65**, 1357–1363.
- Muñoz-Provencio, D., Pérez-Martínez, G. & Monedero, V. (2010). Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *J Appl Microbiol* **108**, 1050–1059.
- Poxton, I. R., McCoubrey, J. & Blair, G. (2001). The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* **7**, 421–427.
- Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H. & Karjalainen, T. (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun* **69**, 7937–7940.
- Terao, Y., Kawabata, S., Kunitomo, E., Murakami, J., Nakagawa, I. & Hamada, S. (2001). Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol Microbiol* **42**, 75–86.
- Voth, D. E. & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* **18**, 247–263.
- Waligora, A. J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A. & Karjalainen, T. (2001). Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun* **69**, 2144–2153.

Les flagelles

II. Rôle des protéines flagellaires dans la colonisation de *C. difficile*

II.1. Phénotype des mutants flagellaires dans l'adhésion *in vitro* et la colonisation *in vivo*

II.1.1. Introduction

Les flagelles jouent un rôle important dans la mobilité, l'adhésion et la virulence de plusieurs pathogènes. Chez *C. difficile*, il a été montré que la flagelline FliC et la protéine de coiffe FliD pouvaient adhérer au mucus murin [192]. En revanche, des anticorps anti-FliC n'inhibent pas l'adhésion des bactéries aux cellules Véro [190]. D'un autre côté, des essais menés *in vivo* avec des souches flagellées et d'autres non flagellées montrent une cinétique d'implantation équivalente pour les deux types de souches. Les souches non flagellées adhèrent néanmoins moins aux caeca que les souches flagellées [192]. L'ensemble de ces résultats suggère l'implication des protéines flagellaires dans le processus de colonisation de *C. difficile*, mais ce rôle n'est pas clairement défini. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de ces protéines et à leur implication dans les processus de colonisation et de virulence de *C. difficile*. L'étude a été réalisée avec les deux souches 630 Δ erm et 027 R20291 afin de déceler d'éventuelles particularités pouvant être liées au caractère épidémique de la souche 027.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Nigel Minton de l'université de Nottingham au Royaume Uni et a donné lieu à une publication en préparation.

II.1.2. Article 2

The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: Comparison of a non-epidemic and an epidemic strain.

Soza T. Baban, Sarah A. Kuehne, Amira Barketi-Klai, Kim R. Hardie, Imad Kansau, Anne Collignon, Nigel P. Minton.

A soumettre

Présentation de l'article

Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés aux protéines flagellaires de *C. difficile* et à leur implication dans les processus d'adhésion, de colonisation et de virulence. Quatre protéines flagellaires ont été spécifiquement étudiées : la protéine du crochet FlgE, la protéine du filament FliC, la protéine de la coiffe FliD et la protéine du moteur de mobilité MotB (figure 15). Pour ce faire, des mutants Δ FliC, Δ FliD, Δ FlgE et Δ MotB ont été construits dans la souche non épidémique 630 Δ erm de PR 012 et dans la souche épidémique R20291 de PR 027. Ces mutants ont été construits, grâce à la technique du ClosTron, dans le laboratoire de Nigel Minton. La caractérisation des mutants par Southern blot, ainsi que les tests de mobilité et de microscopie électronique qui ont permis d'analyser les mutants ont été également réalisés par l'équipe de Nigel Minton. Ils ont ainsi montré que les mutants Δ FliC, Δ FliD et Δ FlgE n'étaient plus flagellés et n'étaient plus mobiles. En revanche, les mutants Δ MotB dans les souches 630 Δ erm et 027, qui sont censés être flagellés et non mobiles, ne présentent pas du tout de flagelles. Ils sont en effet incapables de produire la flagelline FliC. Pour remédier à ce problème, une autre technique de mutation par recombinaison homologue a été utilisée. Grâce à cette technique, il a été possible de remplacer une alanine à la position 23 par un acide aspartique, permettant ainsi de préserver la structure de MotB tout en inhibant sa fonction de rotation nécessaire à la mobilité. Mais, seul un mutant Δ MotB dans la souche 027 a pu être construit avec cette technique. Ce mutant est mono-flagellé et non mobile. Par ailleurs, la complémentation de tous les mutants a révélé le rétablissement total de la production des flagelles et de la mobilité, à l'exception de la souche complémentée FlgE avec laquelle seul un rétablissement partiel a été obtenu.

Dans notre laboratoire, nous avons effectué l'analyse *in vitro* et *in vivo* des ces mutants flagellaires. Pour les analyses *in vitro*, les différents mutants des deux souches 630 Δ erm et 027 R20291 ont été analysés sur des cellules humaines en culture Caco-2. *In vivo*, le mutant Δ FliC dans la souche 630 Δ erm et les mutants Δ FliC et Δ MotB dans la souche 027 ont été étudiés en modèle de souris monoxéniques (infection des souris par une seule souche) et dixéniques (essai de compétition entre deux souches). Comme décrit dans le chapitre précédent, la cinétique d'implantation intestinale a été mesurée par dénombrement des cellules bactériennes dans les fèces de souris et la capacité d'adhésion aux caeca a été déterminée au bout de 7 jours d'infection. Les résultats observés avec l'ensemble des mutants dans les deux souches de *C. difficile* sont tout à fait différents.

Avec la souche 630 Δ erm, nous avons pu montrer que les mutants Δ FliC, Δ FliD et Δ FlgE adhèrent plus aux cellules Caco-2 que la souche sauvage 630 Δ erm. *In vivo*, le mutant Δ FliC présente une cinétique d'implantation semblable à celle de la souche sauvage que ce soit en modèle de souris monoxéniques (Δ FliC seul en comparaison à 630 Δ erm seule), dixéniques (Δ FliC et 630 Δ erm en compétition) ou en modèle de souris à flore humaine. Une plus faible adhésion du mutant Δ FliC aux caeca (après 7 jours d'infection) a pu être observée en essai de compétition entre le mutant Δ FliC et la souche sauvage 630 Δ erm. Les flagelles ne semblent donc pas avoir de rôle prépondérant dans la colonisation intestinale par la souche 630 Δ erm de *C. difficile*. Un essai de virulence réalisé par l'équipe anglaise chez le hamster montre par ailleurs une virulence accrue pour le mutant Δ FliC. Cette virulence pourrait être expliquée par une plus grande production des toxines TcdA et TcdB. Des essais de cytotoxicité et des essais de RT-PCR en temps réel montrent en effet une plus grande cytotoxicité en cellules Véro du mutant Δ FliC et un taux d'expression du gène *tcdA* plus élevé *in vitro*. Chez la souche 630 Δ erm, les flagelles auraient donc un rôle dans la virulence plutôt que dans la colonisation intestinale.

Avec la souche 027 R20291, nous avons observé que les mutants Δ FliC, Δ FliD, Δ FlgE et Δ MotB adhèrent moins aux cellules Caco-2 que la souche sauvage 027 suggérant le rôle des protéines mutées dans le pouvoir d'adhésion de cette souche aux cellules épithéliales. En réalisant les essais de colonisation *in vivo* par le mutant Δ FliC en modèle de souris monoxéniques, nous avons été surpris par la mort de la plupart des souris infectées par ce mutant (70 % de mortalité).

Le mutant Δ FliC serait donc plus virulent chez la souris monoxénique que la souche sauvage 027. En essais de compétition entre Δ FliC (non flagellé et non mobile) et la souche sauvage 027 (flagellée et mobile) et entre Δ FliC et le mutant Δ MotB (flagellé et non mobile), Δ FliC montre des difficultés à coloniser les fèces des souris et à adhérer aux caeca au bout de 7 jours d'infection. Le mutant Δ MotB seul, en modèle de souris monoxéniques, présente en revanche la même cinétique de colonisation que la souche sauvage dans le même modèle. D'après ces résultats, il semble que FliC joue un rôle important dans l'adhésion et la colonisation intestinale par *C. difficile* 027 R20291. De plus, la flagelline jouerait également un rôle dans la virulence bactérienne. La souche flagellée et non mobile Δ MotB semble en revanche se comporter comme la souche sauvage suggérant un rôle moindre de la mobilité dans les processus de colonisation et de virulence de la souche 027 R20291.

Le rôle des protéines flagellaires varie sensiblement selon le type de souche. Il apparaît également que les flagelles et plus particulièrement la flagelline FliC auraient un rôle dans la virulence de *C. difficile* en plus de leur rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales et dans la colonisation de l'intestin.

Title

The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: Comparison of a non-epidemic and an epidemic strain.

Running title

Flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis

Category

Pathogenicity and virulence

Authors

Soza T. Baban¹, Sarah A. Kuehne¹, Amira Barketi-Klai², Kim R. Hardie¹, Imad Kansau², Anne Collignon², Nigel P. Minton^{1*}

¹Clostridia Research Group, School of Life Sciences, University of Nottingham, Nottingham, NG7 2RD, UK; ²Faculté de Pharmacie, Département de Microbiologie, Université de Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France; *Corresponding author

Corresponding author: Prof Nigel P. Minton

Tel. +44 (0)115 84 67458

Fax +44 (0)115 82 32120

Email: nigel.minton@nottingham.ac.uk

ABSTRACT

Clostridium difficile is an important pathogen, causing symptoms ranging from self-limiting diarrhoea to fatal pseudomembranous colitis. It causes high mortality rates and poses a great financial burden on healthcare systems. Whilst the *C. difficile* has two major virulence factors, toxin A and B, it is widely agreed that other components of the bacterium add to different aspects of the disease and these might also vary between different strains. *C. difficile* colonises the gut of humans and animals and hence the processes of adherence and colonisation are essential for it to cause disease. In recent years epidemic strains have emerged that are said to cause more severe infections. Previously it has been suggested that flagella might be implicated in colonisation. Here we tested this hypothesis by comparing flagellated parental strains to strains in which flagella genes were inactivated using ClosTron technology. Some work has previously been published on flagella mutants in strain 630, however no work has been reported on epidemic strains. In this study we have focused on a UK-outbreak strain, PCR-ribotype 027 (B1/NAP1) called R20291. We compared the flagellated wild-type to a mutant with a paralyzed flagellum and also to mutants that do not produce flagella anymore (*fliC*, *fliD* and *flgE* genes inactivated) *in vitro* and *in vivo* (using the mouse model). Our results with R20291 provide the first strong evidence that by disabling the motor of the flagellum, the structural components of the flagellum rather than active motility, is needed for adherence and colonisation of the intestinal epithelium during infection. Furthermore comparison to published data on 630 and our own data on that strain revealed major differences between the strains: the R20291 flagellar mutants adhered less than the parental strain *in vitro*, whereas we saw the opposite in 630. Also we showed that flagella and motility are not needed for successful colonisation *in vivo* using strain 630. Finally our findings show that in strain R20291 flagella do play a role in colonisation and adherence and also that there are striking differences between different strains of *C. difficile*, which suggests that we should always characterize more than just one strain before making general conclusions.

INTRODUCTION

Despite much improved infection control *Clostridium difficile* is still a worldwide problem being the biggest cause of hospital acquired antibiotic associated diarrhoea in America and Europe. Morbidity and mortality rates of nosocomial CDI continue to increase, particularly following the global emergence of epidemic *C. difficile* strains (027/BI/NAP1) [357, 358]. The disease is a big financial burden and in 2010 five times more people died in England and Wales from *C. difficile* than from MRSA. It is well established by now that the 2 large toxins A and B are the main virulence factors of *C. difficile* infection (CDI) [199, 227], despite their respective roles still being the topic of debate and on-going research [267, 268]. However other factors do undoubtedly contribute to disease. Colonisation is clearly a prerequisite event of CDI. To date very little is known about the exact mechanism of how *C. difficile* colonises the gut. Colonisation is a multi-factorial process, which certainly involves contributions of other virulence factors, mainly adhesins expressed on the bacterial surface that can promote colonisation of the host cells, in concert with the main virulence factors toxins A and B. The mucosal surface carpeting the intestinal epithelium is the main site of host-pathogen interaction, in which this organism must both evade the immune response and interact with enterocytes and adhere to specific surface molecules. *C. difficile* possesses multiple surface adhesins, functioning as potential colonisation factors, including cell surface-associated proteins (S-layer and SLPs), fibronectin-binding protein FbpA, proteases such as Cwp84, hydrolytic enzymes, heat-shock proteins such as GroEl [134, 359, 360] and flagellar cap FliD and flagellin FliC structural components [192].

For most gastrointestinal pathogens, flagella and flagellum-mediated motility are recognised as essential elements in their virulence scheme. Bacterial flagella are important multi-purpose structures that have diverse biological functions to favour bacterial survival and host colonisation. Flagella can function as the motility organelle rendering the pathogen more capable of moving towards the site of colonisation to increase the occurrence of potential interactions between the pathogen and the epithelial mucosal surface. This feature contributes to the main role of the flagellum in pathogenesis. For instance, the intestinal enteric pathogens *Listeria monocytogenes* [361] and *Vibrio anguillarum* [362] strictly require functional flagellum-mediated motility to invade their hosts and establish successful colonisation. In addition, the role of flagella in the formation and development of biofilm has recently been demonstrated in these pathogens. The full expression of flagellum-mediated motility as an essential virulence factor is required by *Helicobacter pylori* to initially colonise the stomach and to attain full infection level [363]. As well as being necessary for motility, in some cases the flagellum functions as an adhesin mediating bacterial adhesion to host cell surfaces. For example, the flagellum of enteropathogenic *Escherichia coli*

contributes to adherence to epithelial cells independent of flagellum-mediated motility [364]. Flagellin (FliC) and the flagellar cap protein (FliD) of *Pseudomonas aeruginosa*, are associated with adherence and colonisation of the respiratory tract through recognition of mucin (Muc1), an abundant component protein of airway mucus [365]. In addition, the flagellum can in various pathogenic bacteria, function as a specialized secretion apparatus for the export of virulence-associated non-flagellar proteins (e.g. toxins) through the specialized flagellar export apparatus (FEA) to poison the host. The flagellar- and virulence associated type III secretion systems (T3SS) have remarkably analogous structures with many component proteins present in both systems, having similarities in sequence and function. Moreover, unlike the proteins secreted by the Sec-pathway, the proteins of T3SS and FEA are transported without modifications, as they do not carry typical cleavable N-terminal peptide recognition secretion signal peptides. This was first reported in *Yersinia enterocolitica*, where the FEA was shown to have an important function in the secretion of the non-flagellar virulence protein, YlpA, a phospholipase [366]. In *Campylobacter jejuni*, the secretion of virulence-associated non-flagellar proteins (Cia proteins-*Campylobacter* invasion antigens) by the type III flagellar export machinery of this pathogenic bacterium has also been reported [367]. A more recent study by Tasteyre *et al.*, [192] showed the presence of flagella in 30 out of 47 *C. difficile* strains examined by electron microscopic observation; nevertheless high variation of flagella-related gene content in a collection of 75 *C. difficile* strains at the genome level was detected. Recently, a comparative genomic microarray study using fully sequenced genomes of two PCR-ribotype 027 isolates, an historic strain (CD196) and a modern strain (R20291), revealed some genetic differences between them, particularly in variations of the flagella-related gene content which might be important for *C. difficile* motility, niche adaptation and potential virulence [254].

Full exploitation of functional studies of *C. difficile* pathogenesis has long been hindered due to the lack of effective genetic tools for the construction of isogenic mutants in this organism. This has led to the deployment of restricted and indirect techniques in attempting to define the potential role of flagella in adherence and colonisation of *C. difficile*. Examples include the assessment of the *in vitro* and *in vivo* adhesive properties of recombinant flagellar cap (FliD) and flagellin (FliC) proteins to cultured cells and mucus isolated from axenic mice. Tasteyre *et al.* [192] observed that the presence of flagella increases the capacity of *C. difficile* to associate with the intestinal epithelial tissue. The flagellated, motile *C. difficile* attach more efficiently to the caecal wall of axenic mice than non-flagellated strains of the same serogroup. Moreover, another study [192], investigating attachment of flagellar structural components to cultured intestinal cells *in vitro*, showed that the purified recombinant flagellar cap and flagellin proteins attached to tissue culture cells. It was concluded that flagellin and the flagellar cap may serve as one of the multiple cell-surface adhesins of *C. difficile*, however, no genetic evidence has been provided so far.

In an earlier study [189], isolating *C. difficile* flagella from clinical strains and characterization and expression of the flagellin subunit gene, it was found that flagella do not play a role in adherence since the antiserum that was raised against the purified recombinant flagellin protein did not inhibit adherence to cultured cells.

Recently a paper was published by Dingle *et al.* [368] investigating the importance of flagella in the virulence of *C. difficile* strain 630 Δ *erm*. For the first time they were able to construct isogenic mutants in *fliC* and *fliD*. Interestingly they found that the flagella mutants adhered more strongly to Caco2 cells *in vitro* and showed increased toxicity *in vitro* and *in vivo* tested in the hamster model of infection.

As mentioned previously differences have been found between the flagella region of strain 630 and the epidemic strain R20291. Here we focus on the differences between these two strains in terms of flagella and flagella-mediated toxin regulation. In particular, this study aims to elucidate the mechanism by which flagella contribute to *C. difficile* adhesion to human intestinal epithelial cells and the potential role of motility in colonisation of the intestinal tract in mice through the comparative analysis of directed mutants in specific flagellar genes in both *C. difficile* 630 and R20291. Different strains of *C. difficile* display different degrees of virulence and hence it is important to compare strains before making general conclusions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. All bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. *C. difficile* was routinely cultured on brain heart infusion (BHI) agar (Oxoid) or in BHI broth (Oxoid), with the following antibiotics where appropriate: thiamphenicol (15 μ g ml⁻¹), erythromycin (2.5 μ g ml⁻¹), lincomycin (20 μ g ml⁻¹), D-cycloserine (250 μ g ml⁻¹) and cefoxitin (8 μ g ml⁻¹) or cycloserine/cefoxitin antibiotic supplement (Fluka). Cultures were grown in an anaerobic cabinet (Don Whitney Scientific) at 37°C in an atmosphere of 10% CO₂, 10% H₂ and 80% N₂. For cell toxicity assays and growth curves, Tryptose-yeast (TY) medium (3% [w/v] Bacto tryptose, 2% [w/v] yeast extract, and 0.1% [w/v] thioglycolate, adjusted to pH 7.4) was used. All *Escherichia coli* strains were routinely grown aerobically at 37°C on Luria-Bertani (LB) agar plates or in LB liquid culture in the presence of selective antibiotics where appropriate, with chloramphenicol (25 μ g ml⁻¹), kanamycin (50 μ g ml⁻¹) and ampicillin (100 μ g ml⁻¹).

Table 1: Strains and plasmids used in this study

Name	Description	Source
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> CA434	Conjugation donor	[369]
<i>C. difficile</i> 630	Wildtype, PCR-ribotype 012	Anaerobe Reference Laboratory, Cardiff, Wales
<i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	Wildtype, PCR-ribotype 012, Erythromycin sensitive strain of <i>C. difficile</i> 630	[370]
<i>C. difficile</i> R20291	Wildtype, BI/NAP1/027 Stoke Mandeville (2004-2005) isolate	Anaerobe Reference Laboratory, Cardiff, Wales
CRG3357	<i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm fliC</i> -515a::intron <i>ermB</i>	This study
CRG3356	<i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm fliD</i> -560a:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG3355	<i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm flgE</i> -310s:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG3354	<i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm motA</i> -275a:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG1509	<i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm motB</i> -348s:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG3353	<i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm fliG</i> -663s:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG3351	<i>C. difficile</i> R20291 <i>fliC</i> -430s:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG3350	<i>C. difficile</i> R20291 <i>fliD</i> -121s:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG3349	<i>C. difficile</i> R20291 <i>flgE</i> -311s:: intron <i>ermB</i>	This study
CRG1516	<i>C. difficile</i> toxin A ⁻ B ⁻ double-mutant	[268]
CRG1987	<i>C. difficile</i> R20291- Δ <i>motB</i> (D23A)	This study
CRG3358	CRG3357 containing <i>pMTL-SB1 (fliC</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
CRG3360	CRG3356 containing <i>pMTL-SB2 (fliD</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
CRG3362	CRG3355 containing <i>pMTL-SB3 (flgE</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
CRG3359	CRG3351 containing <i>pMTL-SB1 (fliC</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> R20291	This study
CRG3361	CRG3350 containing <i>pMTL-SB2 (fliD</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> R20291	This study
CRG2705-SB3	CRG311 containing <i>pMTL-SB3 (flgE</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> R20291	This study

CRG23-SB4	CRG23 containing <i>pMTL-SB4</i> (<i>motB</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> R20291	This study
CRG23-SB5	CRG23 containing <i>pMTL-SB5</i> (<i>motB</i> complementation plasmid) in <i>C. difficile</i> R20291	This study
Plasmids		
pMTL84151	Shuttle vector	[371]
pMTL84152	Shuttle vector	[371]
pMTL007C-E2	Clostron plasmid	[372]
pMTL007C-E2: <i>fliC</i> -515a	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>fliC</i> at IS 515 (antisense oriented) for <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
pMTL007C-E2: <i>fliD</i> -560a	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>fliD</i> at IS 560 (antisense oriented) for <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
pMTL007C-E2: <i>flgE</i> -310s	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>flgE</i> at IS 310 (sense oriented) for <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
pMTL007C-E2: <i>motA</i> -275a	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>motA</i> at IS 275 (antisense oriented) for <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
pMTL007C-E2: <i>motB</i> -348s	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>motB</i> at IS 348 (sense oriented) for <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
pMTL007C-E2: <i>fliG</i> -663s	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>fliG</i> at IS 996 (sense oriented) for <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i>	This study
pMTL007C-E2: <i>fliC</i> -430s	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>fliC</i> at IS 430 (sense oriented) for <i>C. difficile</i> R20291	This study
pMTL007C-E2: <i>fliD</i> -121s	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>fliD</i> at IS 121 (sense oriented) for <i>C. difficile</i> R20291	This study
pMTL007C-E2: <i>flgE</i> -310s	Clostron plasmid containing retargeted region to <i>flgE</i> at IS 310 (sense oriented) for <i>C. difficile</i> R20291	This study
pMTL-SB1	pMTL84151 containing 873 bp <i>fliC</i> coding region and 100 bp upstream <i>fliC</i> promoter region	This study
pMTL-SB2	pMTL84151 containing 1,524 bp <i>fliD</i> coding region and 100 bp upstream <i>fliC</i> promoter region	This study
pMTL-SB3	pMTL84151 containing 984 bp <i>flgE</i> coding region and 100 bp upstream <i>fliC</i> promoter region	This study
pMTL-SB4	pMTL84151 containing 696 bp <i>motB</i> coding region and 100 bp upstream <i>fliC</i> promoter region	This study

General molecular biology techniques. DNA manipulations were carried out according to standard techniques [373]. For DNA cloning and PCR analysis, *C. difficile* genomic DNA was prepared using quick Chelex resin-based or phenol-chloroform extraction techniques. DNA was purified from agarose gels using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, UK). Plasmids were isolated from *E. coli* using the

plasmid mini-prep kit (Qiagen, UK) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification was performed using Failsafe high fidelity DNA polymerase (Merk, UK) or Taq polymerase (Sigma) in accordance with the manufacturers' protocols.

Construction of flagellar-associated mutants in *C. difficile* 630 Δ *erm* and R20291. Flagellar target genes were insertionally inactivated in *C. difficile* 630 Δ *erm* and R20291 using the ClosTron gene knock-out system as described previously [374],[372]. The mutants were verified by PCR screening and subsequent DNA sequencing using the primers shown in Table S1.

Complementation of the flagellar mutants. For complementation of the *fliC* mutant, a 973-bp fragment encompassing the *fliC* open reading frame (873bp) with the 100-bp 5' noncoding region which likely encompasses the *fliC* promoter was amplified as a full-length DNA fragment with primers *NotI*-*pfliC*-630-F and *XhoI*-*fliC*-630-R and cloned using *NotI* and *XhoI* into the expression vector pMTL84151 to generate pMTL-SB1. The complementation primers were designed to allow cleavage of the *fliC* promoter and *fliC* gene as a full-length fragment. As the proteins encoded by *fliC*, *fliD*, *flgE* and *motB* are the same in 630 Δ *erm* and R20291, only one plasmid (pMTL-SB1, pMTL-SB2, pMTL-SB3 and pMTL-SB4) was constructed for use in both mutants, respectively. To complement the *fliD* mutant, the *fliC* promoter was joined to the *fliD* gene by using splicing by overlap extension (SOEing) PCR (Horton et al., 1989) with the following primers: *NotI*-*pfliC*-R20291-F/*NdeI*-*pfliC*-*fliD*-R-SOE and *NdeI*-*pfliC*-*fliD*-F-SOE/*XhoI*-*fliD*-R to create two PCR products that were joined in a second step using the primers: *NotI*-*pfliC*-R20291-F/*XhoI*-*fliD*-R. The final product was cloned into the modular expression vector pMTL84151 resulting in pMTL-SB2. Likewise, SOEing PCR was used to construct a complementation plasmid with *flgE* (pMTL-SB3). For complementation of the *motB* (D23A) mutant, the 696-bp *motB* gene was amplified by standard PCR and cloned directly into the modular vector pMTL84152 (pMTL-SB4). All complementation plasmids were transferred into *C. difficile* via conjugation and transconjugants were verified by PCR.

Southern blot. Mutants were verified by Southern blot using an intron specific probe. 2 μ g genomic DNA were digested with HindIII (NEB) overnight. The blots were carried out using a DIG high prime labelling and detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions.

Motility assays. Swarming and swimming motility behaviours of *C. difficile* were studied by performing swarming and swimming motility assays as described by Rashid and Kornberg [375] with minor modifications. Briefly, cultures of *C. difficile* were grown to mid-exponential phase for 8h in BHI broth under anaerobic condition at 37°C. Motility plates were prepared by adding 25ml of agar media into each

plate and let to set for 2 hours for swarm agar plates and overnight for swim agar plates. Soft agar plates were then air-dried for 15 min and transferred into the anaerobic workstation and allowed to pre-reduce for 4 hours prior to inoculation with *C. difficile* strains. The swimming agar was made of BHI broth medium (37g L⁻¹) containing 0.3% (w/v) Difco bacto-agar and the swarming agar with 0.4% agar. To assay swimming plates were stab-inoculated with 3µl of a mid-exponential growth culture of each strain at the same cell density and then incubated at 37°C for 48 hours. Swimming motility was quantitatively determined by measuring the radius. To assay swarming plates were spot-inoculated with 3µl of a mid-exponential growth culture of each strain and incubated as described above. Swarming motility was quantitatively determined by measuring the radius of the swarming zone. Motility assays were performed in six replicates for each strain and repeated independently three times.

Transmission Electron Microscopy (TEM). Electron microscopy was performed to examine the presence of flagellar structures on the surface of *C. difficile*. Cells were negatively stained using 0.5% Uranyl acetate (pH 4.5, Agar Scientific) on carbon formvar copper 200-mesh grids (Agar Scientific Ltd., UK). Briefly, cells from a mid-exponential *C. difficile* culture were adsorbed onto Formvar-coated copper grid for 5 min and the excess was carefully removed with blotting paper. This preparation was then fixed on the grid with 1% glutaraldehyde for 1 min. The grid was washed three times quickly with sterile distilled water for 10s and cells were negatively stained with Uranyl Acetate for 30s. The air-dried grid was visualized using the JOEL JEM1010 transmission electron microscope, operating at 80 kV.

Cell culture. The human intestinal epithelial cell line Caco-2 and Vero cells (derived from African Green monkey kidney) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, via Health Protection Agency, UK). Caco-2 and Vero cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 1% (v/v) nonessential amino acids (NEAA) and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution (containing penicillin [1U.ml⁻¹], streptomycin [1g.ml⁻¹], and amphotericin B as fungizone [2.5mg.ml⁻¹]). For cell adherence assays, 12-well tissue-culture plates were seeded with 1 x 10⁶ Caco-2 cells per well and cells were grown for 9 days to obtain differentiated confluent monolayers. For cell cytotoxicity assay, 96-well tissue-culture plates was seeded at a density of approximately 0.25 x 10⁵ Vero cells per well and cells were grown for 48 hours to obtain a confluent monolayer.

Caco-2 cell adherence assay. The adherence of the *C. difficile* strains to differentiated human colonic enterocyte-like Caco-2 cells was assessed in the *in vitro* cell-culture adherence model under anaerobic condition using the protocol described recently by Barketi-Klai *et al.* [376] with the following modifications: 16 hour cultures of *C. difficile* were harvested by centrifugation at 4000x g for 3 min. Cell

pellets were resuspended gently in 1ml of the cell-line culture medium. Caco-2 cells were infected with 1×10^8 cells. ml⁻¹ *C. difficile* by adding 1ml of culture to each well of the 12-well tissue-culture plate and plates were then incubated for 1 hour 30 min at 37°C under anaerobic condition. Initial bacterial counts were determined by plating onto selective BHI plates prior to infection. After incubation, monolayers were washed four times with sterile PBS to remove non-adherent bacteria. Then 1ml of saponin 1% was added to each well, incubated for 10min and attached bacteria were detached from cell monolayer by repeated pipetting. Bacterial counts at post-infection were determined by plating serial dilutions on selective BHI agar plates in triplicates. Colonies were counted after 24 hour incubation. In parallel, uninfected monolayers (negative control) were collected by trypsinization and counted by trypan blue staining in order to express the adherence results as number of viable adherent CFU per one Caco-2 cell. Each adherence assay was performed in triplicate, and repeated at least three times in its entirety.

Vero cell cytotoxicity assay. The kinetic of toxin secretion was examined in culture supernatants of *C. difficile* strains at different time points during growth (determined from early exponential to late stationary phase of growth) using Vero cell cytotoxicity assay as described previously by Kuehne *et al.* [268]

Production of *C. difficile* culture supernatant filtrates. For the Vero cell cytotoxicity and GDH enzymatic activity determination assays, *C. difficile* strains were grown as follows. Overnight cultures in TY were used to set up a new starter culture using 1/100 inoculum. 2ml of each *C. difficile* culture was collected at different time points during bacterial growth after recording OD₆₀₀. Cells were harvested by centrifugation at 15000xg for 10 min at 4°C and the supernatant was filter-sterilized through 0.2µm syringe filters (Sartorius, Germany). Filtered supernatant samples were then immediately frozen at -20°C to be used later for these assays.

Preparation of *C. difficile* crude-cell extracts. For the GDH enzymatic assay, whole cell protein extracts (soluble cytoplasmic fraction) were prepared at different time points during bacterial growth as follows: cell pellets from 2ml *C. difficile* culture were harvested by centrifugation at 13000xg for 10 min, and lysed by resuspending in 200µl Bugbuster 10X protein extraction buffer (Novagen UK) containing 2µl of Benzonase Nuclease reagent (25U.µl⁻¹, containing 50 mM tris-HCl, 20 mM NaCl, and 2 mM MgCl₂, pH 8.0; Novagen UK) and 10µl of rLysozyme solution (100µg.ml⁻¹; Novagen UK). After 1h incubation at room temperature with agitation, debris was pelleted by centrifugation at 13000xg for 20 min at 4°C and the crude cell extracts transferred to a new microfuge tube and stored at -20°C for later use.

Glutamate dehydrogenase enzyme assay. Glutamate dehydrogenase assay was performed using a previously described methodology [377] with minor modifications. Briefly, the glutamate dehydrogenase enzyme activity in *C. difficile* culture supernatant and soluble fraction was measured at 340 nm at 25°C with reaction mixture containing 0.333ml of 300 mM Potassium Phosphate Buffer (pH 8.0), 0.167ml of 300 mM L-glutamic acid (pH 7.5), 0.15ml of 1 mM β -NAD, 0.333ml of deionized water, and 0.017ml of test sample. GDH enzyme (Sigma Chemical Co., UK) was used as the positive control. The reagents were added in the following order: Potassium Phosphate Buffer; L-glutamic acid; β -NAD; deionized water and finally the reaction was started by adding 6U.ml⁻¹ of GDH [EC 1.4.1.3] as positive control or tested sample. The GDH activity was measured spectrophotometrically by recording the increase in absorbance at 340 nm for 5 min and the total absorbance was obtained by using the maximum linear rate for both tested samples and controls. GDH activity was calculated using the molar extinction coefficient for NAD(P) as 6.22 mM⁻¹ x cm⁻¹. Enzyme specific activity was defined as one unit of GDH enzyme required to oxidate 1.0 mmole of L-glutamate to α -ketoglutarate per minute using NAD(H) or NADP(H) as cofactors, at pH 8.0 and 25°C.

RNA extraction and reverse transcription. These procedures were carried out essentially as described previously by Lyras *et al.* [267] with the following modifications. Total RNA was extracted from *C. difficile* grown to early stationary phase (16 hours) in TY broth in four independent replicates for each strain. RNA stabilization was achieved by using RNAprotect Bacteria Reagent and an RNeasy Mini Kit (Qiagen) as described by the manufacturer's instructions. RNA isolation was then carried out using the FastRNA pro Blue extraction Kit (MP Biosciences), followed by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) treatment and precipitated with ethanol according to the manufacturer's instructions. The total-RNA was dissolved in 50 μ l of RNase-free water (DEPC-treated water) and DNase I digestion was then carried out to remove contaminating DNA in RNA samples by adding TURBO DNase buffer and TURBO DNase (Ambion) and incubated at 37°C for 1 hour, according to the manufacturer's instructions. The RNA was purified using the RNeasy spin column purification kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were eluted from the spin column in two volumes of 20 μ l of DEPC-treated water. The concentration of RNA samples was measured using the nanodrop spectrophotometer and stored at -80°C. The integrity and quality of extracted *C. difficile* RNA was determined using the Prokaryote Total RNA Pico assay by the Agilent 2100 bioanalyzer according to the manufacturer's instructions before use in RT-PCR. The absence of contaminating DNA in extracted RNA samples was confirmed by PCR with *fliC* gene specific primers. First-stranded cDNA synthesis was carried out by reverse transcription on 2 μ g template RNA using Omniscript RT kit (Qiagen, UK) with

random hexamer primers (Promega, UK) according to manufacturer's specifications. The cDNA samples were then purified using Qiaquick columns (Qiagen, UK).

qRT-PCR (reverse transcriptase) analysis of *tcdA* gene expression. Real-time quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) experiments were performed using the AB7500 cyclor real-time PCR instrument. The qRT-PCR primers were designed and reactions were carried out using the SYBR Green Master Mix (Ap Biosciences, UK) with cDNA as template, as described by Lyras *et al.* [267]. PCR were performed on duplicate cultures and results were evaluated using *rpoA* as the endogenous control.

Gnotobiotic mouse models. C3H/HeN germ-free (6-8 weeks old) and human microbiota-associated mice, obtained from INRA of Jouy-en-Josas (ANAXEM, France), were housed in sterile isolators provided with sterilized bedding and received standard nutrients sterilized by irradiation, and water sterilized by autoclaving. Prior to infection with *C. difficile* strains, sterility of axenic mice was confirmed by testing faecal culture of all tested animals. Faecal pellets were collected from mice, homogenised and serial dilutions were plated on BHI agar plates. Following 24 hour incubation, plates showing no growth of bacteria indicated that tested animals were considered germ-free. Cultures of *C. difficile* for challenge were prepared for each mouse model according to the method described recently by Barketi-Klai *et al.*[376].

For the independent challenges (monoxenic mouse model), single infections of 1×10^8 *C. difficile* were performed by oral gavage route on groups of 6 axenic mice. For the co-challenge (competition colonisation assay) (dixenic mouse model), mice were co-infected by oral gavage with 1×10^8 bacterial CFU comprised of 1:1 ratio of wild-type and mutant. Human Microflora Associated mice (HMA) were dosed with 3mg of amoxicillin/clavulanic acid (8/1: v/v) by oral gavage on 8 consecutive days to disrupt the intestinal microbiota. 24 hours after the last antibiotic administration, each mouse was challenged with 1×10^8 bacterial CFU. In these *in vivo* mouse models of colonisation, two parameters were studied as a surrogate for determining the level of *C. difficile* intestinal colonisation, these were:

(1) Intestinal implantation (*C. difficile* faecal shedding). The concentration of *C. difficile* CFU recovered in faeces during the course of infection (kinetic of faecal shedding) was determined by homogenising and plating on *C. difficile* selective agar medium (supplemented with antibiotics, where appropriate).

(2) Caecal adherence. The *C. difficile* caecal colonisation was studied by determining the level of *C. difficile* associated to the caecal wall of mice. Seven days after *C. difficile* challenge, mice were euthanized, dissected to excise the entire caecum of each mouse. Each caecum was rinsed in sterile PBS

and weighed. The caecum of each mouse was harvested by homogenising using the ultra-Turrax apparatus (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) for 1 min at 12000 \times g using and diluted in PBS to obtain a final concentration of 10mg.ml⁻¹. Ten-fold serial dilutions were then cultured on BHI agar plates (supplemented with antibiotics, where appropriate). Colonies were counted after 48 hour incubation at 37°C under anaerobic condition.

In vivo hamster model of C. difficile disease. Single infections of female golden Syrian hamsters, 100-130 g (Charles River Laboratories, UK), were performed with 1000 CFU spores of *C. difficile* by oral gavage 5 days post-clindamycin treatment (30 mg kg⁻¹), as described previously by Kuehne *et al.*[268]. *C. difficile* spore suspensions were prepared according to the protocol described by Burns *et al.* [331]. Cultures of *C. difficile* strains were grown anaerobically at 37°C on non-selective BHIS agar plates for 5 days to produce spores, heat-treated and plated and spore counts obtained. To determine the level of intestinal colonisation, faecal pellets were collected daily and concentration of *C. difficile* CFU shed in faeces was determined on TCCFA selective agar medium supplemented with antibiotics where appropriate. Caecum tissue samples from each hamster was harvested by homogenisation and plated to determine the level of *C. difficile* association to caecal wall of each hamster.

PCRs were performed using specific primer pair for each tested hamster group to authenticate the genotype of each bacterial strain, as follows: primer sets 3800 and 10050 or 11870 and 12870 were used to confirm the cells were derived from wild-type parental *C. difficile* 630 Δ erm. A combination of *fliC* gene-specific and intron-specific primer pair was used to distinguish between the *fliC* mutant and wildtype *C. difficile* 630 Δ erm strain, as listed in Table S2.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using StatEL and GraphPad Prism software. Data were analysed by Mann-Whitney test (mice experiments), Student's *t*-test, one-way analysis of variance ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test (cytotoxicity and GDH assays). A statistically significant difference was considered to be P values of <0.05.

RESULTS/DISCUSSION

Construction and phenotypic characterizations of flagellar-associated mutants of *C. difficile* 630 Δ erm and R20291.

In order to analyse the role of flagella in the pathogenesis of *C. difficile* three different mutants were made in both R20291 and 630 Δ erm. Using ClosTron technology [372] we insertionally inactivated *fliD*, coding

for the flagella cap, *fliC*, encoding flagellin and *flgE*, encoding the hook protein. The resultant mutants CRG3357 (Cdi630 Δ *erm*-*fliC*515a::CT), CDR3356 (Cdi630 Δ *erm*-*fliD*560a::CT), CRG3355 (Cdi630 Δ *erm*-*flgE*310s::CT), CRG3351 (CdiR20291-*fliC*430s::CT), CRG3350 (CdiR20291-*fliD*121s::CT) and CRG3349 (CdiR20291-*flgE*311s::CT) were verified by PCR using a gene specific and an intron specific primer to amplify across the junction (shown in supplementary data, figure S1). PCR products were also sequenced. Southern blot analysis using an intron specific probe confirmed that only one insertion had occurred in each mutant (Fig. 1). A Western blot probing against FliC with a polyclonal antibody revealed that none of the mutants produced anymore flagellin, while it was readily detected in the parental strains (data not shown). Motility of the mutants was tested on swimming and swarming plates and compared to the parental strains. Whereas both 630 Δ *erm* and R20291 showed motility on plates (Fig. 2a) all three mutants in the respective strains were completely immobilized (Fig. 2a). These strains were then complemented using plasmid pMTL84151 and the *fliC* promoter region plus either the *fliC* gene, resulting in plasmid pMTLSB-1, the *fliD* gene giving pMTLSB-2 or the *flgE* gene creating pMTLSB-3. pMTLSB-1 was introduced into the *fliC* mutants CRG3357 and CRG3351 and successfully complemented the motility phenotype. Likewise pMTLSB-2 introduced into CRG3356 and CRG3350, the *fliD* mutants, complemented that phenotype back to wild type. However complementation of CRG3355 and CRG3349 with pMTLSB-3 was only partial probably due to the fact that the *fliC* promoter controls gene expression in class three of flagella genes, whereas *flgE* is transcribed as a class two gene. Disrupting the highly organised flagella assembly by inappropriate transcription signals might be an explanation why no full complementation was achieved with these constructs. (Fig. 2a) All strains, parental, mutants and complements, were examined under the transmission electron microscope (TEM). Interestingly we observed a great difference between 630 Δ *erm* and R20291. Whereas 630 Δ *erm* was peritrichously flagellated, R20291 was monotrichously flagellated, only a single flagellum was present on its surface. This might explain why R20291 displayed less motility in the swimming and swarming assays. No flagella were observed for any of the flagella mutants. (Fig. 2b)

Construction of a paralyzed flagellum.

To address the question as to whether flagella act as adhesins or function merely as motility apparatus we generated mutants in the motor genes *motA* and *B* and also in the rotor gene *fliG*. After analysis of these mutants via TEM and motility plates we noticed that these mutants were not able to swim or swarm and the TEM revealed a complete lack of flagella for the *motB* and the *fliG*-mutant and a 50% reduction for the *motA*-mutant. This finding is in line with previously reported data in *Listeria monocytogenes* [361],

showing that a complete disruption of motor genes leads to loss of flagella. We can hence conclude that that these genes do not only play a role in the motor but also act as a structural component. A multiple alignment showed that the aspartate residue at position 23 was highly conserved. This residue has successfully been changed in *Listeria* to obtain a paralyzed flagellum. Using homologous recombination we changed aspartate 23 to alanine in *C. difficile* R20291 (shown in supplementary data, figure S2) and examined the mutant under the TEM and in motility assays (data not shown). The microscopy revealed a single flagellum, like the wild type, but no motility was observed. This strain, R20291 *motB*:D23A, was used alongside the structural flagella mutants in *in vitro* and *in vivo* adherence assays.

The flagellum of R20291 is used as an adhesin, not for motility, to enhance bacterial association to human intestinal epithelial cells *in vitro*.

Previous data focused on the non-epidemic *C. difficile* strain 630 and it has been shown that both a *fliC* and a *fliD* mutant adhere better to Caco-2 cells than the wild-type, putting their role in adherence into question [368]. In addition we tested the *flgE* mutant of 630 Δ *erm*, which also adhered more than the wild-type (data not shown). We examined for the first time the role of flagella in the epidemic strain R20291. To test adherence we used Caco-2 cells and assayed them with the flagella mutants, paralyzed mutant, wild type and complemented strains (Fig. 3). All flagella mutants adhered less than the wild-type. In particular the *fliC*, *fliD* and *flgE*-mutant all adhered less than the paralyzed *motB*-mutant, which still adhered significantly less than the wild-type ($p < 0.05$). These results indicate an important role for flagella of R20291 in adherence and moreover show that the intact flagellar structure possesses adhesive properties, which contribute independently of flagellum-mediated motility. These findings are in contrast to results obtained with strain 630 Δ *erm* (this study and [368]), which adheres less than flagella mutants.

Assessment of importance of the flagellum of R20291 in intestinal colonisation of gnotobiotic mice.

As flagella in R20291 seem to play a role in adherence we tested the wild-type, the *fliC*-mutant (CRG3351) and the paralyzed flagellum mutant (CRG1987) *in vivo* using first the monoxenic mouse model for a single infection study and then the diaxenic mouse model for a competition experiment.

(i) monoxenic mouse model (individual mouse infection study)

All 6 mice infected with the wild-type R20291 survived the entire experimental duration (7 days) without succumbing to *C. difficile* disease. Colonisation was monitored through faecal shedding kinetics and at the end of the experiment adherence to the caecum was measured. Surprisingly 70% of mice infected with

the *fliC*-mutant CRG3351 succumbed to *C. difficile* disease by four days (Fig. 4A). A comparison between the wild-type and the paralyzed mutant revealed no difference in faecal shedding (Fig. 4B) and also no significant difference in adherence to the caeca (Fig. 4C). These findings suggest that flagella-associated motility is not needed for successful colonisation and adherence in mice; however the structure of the flagellum itself is important as an adhesin. Further investigation is necessary to understand the increased virulence of the *fliC*-mutant.

(ii) dioxenic mouse model (competitive colonisation)

To reconfirm the results obtained in single infection and to further investigate the advantage for R20291 to have flagella we co-challenged mice with a 1:1 inoculum of wild-type and *fliC*-mutant. The wild-type clearly out-competed the non-motile CRG3351 strain, showing increased colonisation (kinetics in Fig. 5A) and also adherence to the caeca (Fig. 5B). We then co-challenged mice with the *fliC*-mutant and the paralyzed mutant (1:1). The paralyzed mutant out-competed the *fliC*-mutant in colonisation and adherence (data not shown), reconfirming the role of flagella as adhesins during colonisation. These *in vivo* experiments have further shown that flagellum-mediated motility is neither important nor essential for virulence of *C. difficile* R20291.

Conclusion

Taken together these *in vitro* adherence and *in vivo* intestinal colonisation studies provide the first strong evidence that by disabling the motor of the flagellum, the structural components of the flagellum of *C. difficile* R20291 rather than active motility, is needed for adherence and colonisation of the intestinal epithelium during infection.

Comparison between the epidemic strain R20291 and non-epidemic isolate 630 Δ erm

Previous flagella studies in *C. difficile* focused on the non-epidemic strain 630 Δ erm. As epidemic strains, particularly those from ribotypes 027 and 078 are becoming increasingly more common it is important to insure that findings hold true in these strains as well. In this study we observed differences between the two parental strains used, which is not all that surprising as differences in the flagella regions of R20291 and 630 have been described previously [254]. In contrast to the petrichiously flagellated 630 Δ erm, R20291 only displays a single flagellum. This reflects also in lesser motility on plates. When tested in adherence assays *in vitro* 630 and 630 Δ erm adhered significantly less to Caco-2 cells than R20291. Interestingly flagella mutants of R20291 showed

decreased adherence whereas the same mutants in a 630 background adhered more than the wild-type. (Data not shown.)

***In vivo* colonisation of *C. difficile* 630 Δ *erm* and the *fliC*-mutant CRG3357**

It has been reported previously that a *fliC* and a *fliD*-mutant in 630 Δ *erm* [368] show higher toxicity levels than the parental strain and also that hamsters infected with those strains succumb to disease quicker. However Dingle *et al.*, 2011 [368] did not use the mouse *in vivo* model to analyse colonisation and adherence within the animal. We compared the parental strain 630 Δ *erm* to the *fliC*-mutant, CRG3357, in three different mouse models. Firstly we infected groups of six human-microflora-associated (HMA) mice with the respective strains. This model is closest to humans as the implanted microflora gets disturbed by antibiotics prior to the bacterial challenge. We did not find any difference between the colonisation kinetics or adherence to the caecum between the two groups (data in supplementary figure S3A and B). The microflora might mask some subtle differences between wild-type and mutant though. We hence tested the strains in the monoxenic mouse model in a single infection study. Again the *fliC*-mutant colonised and adhered at the same level as the wild-type (figure S3C and D) leading to the conclusion that flagella are not required for strain 630 Δ *erm* to colonise. In order to detect any subtle differences between the strains we finally did a co-infection study, giving the mice a 1:1 inoculum of wild-type and *fliC*-mutant. Although the kinetics remained overall similar there were minor differences at several time points (figure S3E) indicating a fitness advantage of the wild-type. Furthermore the *fliC*-mutant adhered significantly less to the mouse caecum than the wild-type (figure S3F). In conclusion, these results show that flagella and motility are not required for *C. difficile* 630 to colonise; however, flagellum motility may contribute to the fitness of the bacterium and allow the wild-type strain to outcompete the *fliC*-mutant. Interestingly, a similar study with *Helicobacter pylori* presented data consistent with our findings observing that competition of motility mutants with wild-type *H. pylori* during mixed infections results in more attenuation than observed in independent challenges in mice. Moreover similar studies by Lane *et al.* (2005)[378] and Wright *et al.* (2005)[379] presented data consistent with our findings in that a *fliC* mutant of UPEC was at a competitive disadvantage during mixed infection with the parental strain in a dixenic mouse model; the mutant and the wild-type, however, colonised to levels that were not significantly different during an independent challenge.

Toxin production of 630 Δ *erm* and flagella mutants in comparison to R20291 and flagella mutants

As said increased toxicity has been measured in the *fliC* and *fliD*- 630 Δ *erm* flagella mutants [368]. Here we have additionally measured the toxicity of a *flgE*-mutant in 630 Δ *erm* (figure S4). In contrast to the *fliC* and *fliD*-mutant the *flgE*-mutant showed reduced toxicity compared to the wild-type. Interestingly no difference in cytotoxicity was observed when comparing R20291 and its flagella mutants (data not shown). We performed glutamate dehydrogenase (GDH) assays in order to investigate whether increased cell lysis is responsible for more toxin being released in the *fliC* and *fliD*-mutants of 630 Δ *erm*. GDH activity in all strains tested did not show any significant difference (data not shown) leading to the conclusion that cell lysis cannot explain the altered levels of toxins in the culture supernatant of the flagella mutants. In order to investigate whether the increased amount of toxicity in the mutants was due to altered levels of expressed toxin genes we performed qRT-PCR comparing the relative expression of *tcdA* (encoding for toxin A) in each flagellar mutant (*fliD*, *fliC* and *flgE*) to the parental strain 630 Δ *erm*. Total cellular RNA was extracted during late exponential to early stationary phase of growth, after 16 hours. The results of qRT-PCR analysis showed that the expression of the *tcdA* gene was strongly up-regulated in the *fliC* and *fliD*-mutants. The expression of *tcdA* was on average 44.1 fold greater in the *fliC* mutant and 7.4 fold greater in the *fliD*-mutant than in the wild-type strain (figure S5). These results confirmed that the high levels of toxin in the *fliD* and *fliC*-mutants were indeed due to increased expression of the *tcdA* gene. In the case of the *flgE*-mutant *tcdA* expression was on average 10 fold lower compared to the wild-type strain (figure S5).

Taken together, these observations provide good experimental evidence that inactivation of flagellar cap (*fliD*), flagellin (*fliC*) and hook (*flgE*) genes have had an influence on the expression of *tcdA*. However, the mechanism underlying this regulatory relationship between the synthesis of flagella structure and regulation of toxin production is as yet unknown. The bacterial flagella system is tightly regulated in an ordered cascade, which uses a series of intermediate assembly stages as checkpoints. This tight regulatory control is required because the production of flagella and rotation are a metabolically costly undertaking for the cell, in which as many as 20,000 to 30,000 flagellin subunits are produced and their secretion outside of the cell and subsequent polymerization requires about 2% of the cell's energy expenditure. In flagella mutants, this metabolic energy is saved and can perhaps be used for other cell functions, such as production of toxin A and toxin B. On the other hand, we observed a decrease of toxin expression level in the *flgE*-mutant, which suggests a regulatory mechanism between flagella and toxin expression at least in

630 Δ *erm*. Moreover, the GDH enzyme assay confirmed that the increase of toxin level in supernatants of the *fliD* and *fliC*-mutants was not due to an increase in cell lysis.

Recently a paper was published investigating the modulation of toxin transcription by the flagellar regulon. [380] The authors compared a *fliC*-mutant in 630 Δ *erm* to the parental strain and a set of early flagella genes including *fliF*, *fliG* and *fliM*. As before they found that a *fliC*-mutant produces more toxin than the wild-type and like in this study that *tcdA* expression is up-regulated. All the mutants in the early flagella genes showed a down-regulation of toxicity and *tcdA* expression comparable to our finding with the *flgE*-mutant. Furthermore they showed that these mutants exhibit less virulence in the hamster infection model. In addition to the transcription of *tcdA* they also examined *tcdB*, encoding toxin B, by qRT-PCR. Changes were more subtle, but might yet be important given the toxic effect of toxin B.

OVERALL CONCLUSION

This study compares the effect of flagella and flagellum-mediated motility between the non-epidemic *C. difficile* strain 630 Δ *erm* and the UK outbreak strain R20291. R20291 only displays a single flagellum whereas 630 Δ *erm* is peritrichously flagellated. It has been shown previously that flagella mutants in 630 Δ *erm* [368] adhere better to Caco-2 cells than the parental strain. Here we show that flagella mutants in R20291 on the contrary adhere less *in vitro*. Mice experiments in 630 Δ *erm* and mutants revealed that flagella are not required for adherence and colonisation in this strain, but flagella-mediated motility might contribute to an overall fitness of the bacteria. An increase in toxicity was noted in mutants in the late flagellar genes (*fliC* and *fliD*) in 630 Δ *erm*, which was not due to increased lysis. We confirmed by qRT-PCR that expression of the toxin A gene *tcdA* was increased in these mutants. The *flgE*-mutant in 630 Δ *erm* showed lower cyto-toxicity and also a decreased expression of *tcdA*. These results were confirmed by a recent study by Aubry *et al.*, 2012 [380] analysing a *fliC*-mutant as well as mutants in early flagellar genes. Looking at R20291 however we did not see any change in toxicity between the wild-type and the flagellar mutants. Mice experiments showed that flagellum-mediated motility is not necessary for colonisation and adherence; however a paralyzed flagellum mutant showed that the filament structure acts as an adhesion. More work is needed to understand the implication of the flagella regulon of R20291 on toxin expression. Our study shows that there are important differences between different strains of *C. difficile* and that it is important to study phenomena in these different strains.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the UK Medical Research Council, UK (G0601176) and the European Union (HEALTH-F3-2008-223585).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Southern blotting analysis. Southern hybridization of the ClosTron flagellar mutants of *C. difficile* 630 Δ *erm* strain using the intron probe to *ermB* in order to demonstrate the presence of a single intron insertion in mutants. Chromosomal genomic DNA of all strains was digested overnight with *Hind*III restriction enzyme, along with the retargeting ClosTron plasmid DNA. The DIG-labelled probe was designed to target the ErmRAM sequence and the results demonstrate the presence of only one single copy of ErmRAM in each mutant. The control plasmid represents the ClosTron retargeting *fliC* vector (pMTL007C-E2:*fliC*- 430s-R20291) (lane 1); Wild-type represents the *C. difficile* 630 Δ *erm* and R20291 strains (lane 2); Lanes 3 to 5 represents three isogenic ClosTron motility mutants. The arrow shows the obtained single group II intron insertion band of the expected size in each mutant. The *flgE* mutant or *C. difficile* R20291, in which the occurrence of only single intron insertion in the D630-*flgE*::*CTermB* mutant was confirmed using 1:10 (lane 3) and 1:100 (lane 4) dilutions of digested chromosomal DNA of this mutant hybridized to intron probe. The arrow shows the obtained single group II intron insertion band of the expected size in the mutant.

Figure 2 Phenotypic assays of parental strains and flagella mutants (A) Swimming motility of the parental strains and flagella mutants and complemented strains. (B) Transmission electron microscope (TEM) examination of wild-types and flagellar mutant. Cells were negatively strained with 0.4 % URA and visualized by TEM (Scale bar represents 2 μ m).

Figure 3 Adherence of *C. difficile* R20291 flagella mutants to human intestinal epithelial Caco-2 cell-line is impaired. Differentiated monolayers of Caco-2 cells were incubated with each of *C. difficile* R20291 wild-type strain, non-motile non-flagellated mutants (CRG430, CRG122, CRG2705), non-motile paralyzed-flagellated *motB* (D23A) mutant and the complemented strains (CRG-SB1, CRG-SB2, CRG-SB3, and CRG-SB4). Cell adherence level was measured by the bacterial adherence assay as described in Chapter 2. The presented data are means \pm standard errors of the means for three independent experiments. Statistically significant differences in flagellar mutants compared to *C. difficile* R20291 wild-type are represented by*for $P < 0.05$.

Figure 4 Role of *C. difficile* R20291 flagellum in intestinal colonisation of mono-axenic mice. (A) Kaplan-Meier plot survival analysis of mono-axenic mice infected with *C. difficile* R20291 and *fliC* mutant, (B) Kinetic of intestinal implantation by the *C. difficile* R20291 wild-type strain and non-motile non-flagellated *motB* mutant. Mice (n =6) were challenged with 1×10^7 bacteria of single *C. difficile* strain. Faecal pellets were collected and processed at regular time intervals daily during a week to determine the kinetic of faecal shedding (CFU per g of faeces) for each of the two strains, as described in Materials and Methods. (C) Adherence of motile flagellated *C. difficile* R20291 wild-type strain and the non-motile non-flagellated *fliC* mutant to mouse caecum. The entire caecum of each mouse was collected at day 7 post-infection, and processed for determination of adhered viable CFU to caecum tissue of mice as described in Chapter 2. Results are presented as the number of adhered *C. difficile* per g of caeca. Statistically significant difference is indicated by * for $P < 0.05$.

Figure 5 Role of *C. difficile* R20291 flagellum in intestinal colonisation of di-axenic mice with non-motile non-flagellated *fliC* and paralyzed-flagellated *motB* mutants. (A) Kinetic of intestinal implantation by wild-type strain and non-motile non-flagellated *fliC* mutant. Each mouse was co-challenged with the 2 strains and kinetic of faecal shedding was monitored by using the same protocol described for in the mono-axenic mice model, as outlined in Chapter 2. (B) Caecal colonisation of motile flagellated *C. difficile* R20291 wild-type strain and the non-motile non-flagellated *fliC* mutant. Statistically significant difference is shown by * for $P < 0.05$

REFERENCES

- Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory & R. Ramphal (1998).** "The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion." *Infection and immunity* **66**(3), 1000-1007.
- Aubry, A., G. Hussack, W. Chen, R. KuoLee, S. M. Twine, K. M. Fulton, S. Foote, C. D. Carrillo, J. Tanha & S. M. Logan (2012).** "Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile*." *Infection and Immunity*.
- Barketi-Klai, A., S. Hoys, S. Lambert-Bordes, A. Collignon & I. Kansau (2011).** "Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonisation." *Journal of medical microbiology* **60**(Pt 8), 1155-1161.
- Burns, D. A., J. T. Heap & N. P. Minton (2010).** "The diverse sporulation characteristics of *Clostridium difficile* clinical isolates are not associated with type." *Anaerobe* **16**(6), 618-622.
- Calabi, E. & N. Fairweather (2002).** "Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*." *Journal of bacteriology* **184**(14), 3886-3897.
- Cartman, S. T., J. T. Heap, S. A. Kuehne, A. Cockayne & N. P. Minton (2010).** "The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*." *International journal of medical microbiology : IJMM* **300**(6), 387-395.
- Dingle, T. C., G. L. Mulvey & G. D. Armstrong (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.
- Eaton, K. A., S. Suerbaum, C. Josenhans & S. Krakowka (1996).** "Colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes." *Infection and immunity* **64**(7), 2445-2448.
- Genth, H., S. C. Dreger, J. Huelsenbeck & I. Just (2008).** "*Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(4), 592-597.
- Giron, J. A., A. G. Torres, E. Freer & J. B. Kaper (2002).** "The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells." *Molecular microbiology* **44**(2), 361-379.
- Heap, J. T., S. A. Kuehne, M. Ehsaan, S. T. Cartman, C. M. Cooksley, J. C. Scott & N. P. Minton (2010).** "The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined." *Journal of Microbiological Methods* **80**(1), 49-55.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter & N. P. Minton (2007).** "The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*." *J Microbiol Methods* **70**(3), 452-464.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman & N. P. Minton (2009).** "A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids." *J Microbiol Methods* **78**(1), 79-85.
- Hennequin, C., C. Janoir, M. C. Barc, A. Collignon & T. Karjalainen (2003).** "Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*." *Microbiology* **149**(Pt 10), 2779-2787.
- Hussain, H. A., A. P. Roberts & P. Mullany (2005).** "Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630Deltaerm) and demonstration that the conjugative transposon Tn916DeltaE enters the genome of this strain at multiple sites." *J Med Microbiol* **54**(Pt 2), 137-141.
- Just, I., J. Selzer, M. Wilm, C. von Eichel-Streiber, M. Mann & K. Aktories (1995).** "Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B." *Nature* **375**(6531), 500-503.
- Killgore, G., A. Thompson, S. Johnson, J. Brazier, E. Kuijper, J. Pepin, E. H. Frost, P. Savelkoul, B. Nicholson, R. J. van den Berg other authors (2008).** "Comparison of seven techniques for typing

- international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing." *Journal of clinical microbiology* **46**(2), 431-437.
- Konkel, M. E., J. D. Klena, V. Rivera-Amill, M. R. Monteville, D. Biswas, B. Raphael & J. Mickelson (2004)**. "Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus." *Journal of bacteriology* **186**(11), 3296-3303.
- Kuehne, S. A., S. T. Cartman, J. T. Heap, M. L. Kelly, A. Cockayne & N. P. Minton (2010)**. "The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection." *Nature* **467**(7316), 711-713.
- Lane, M. C., V. Lockatell, G. Monterosso, D. Lamphier, J. Weinert, J. R. Hebel, D. E. Johnson & H. L. Mobley (2005)**. "Role of motility in the colonisation of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract." *Infection and immunity* **73**(11), 7644-7656.
- Lyerly, D. M., L. A. Barroso & T. D. Wilkins (1991)**. "Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase." *Journal of clinical microbiology* **29**(11), 2639-2642.
- Lyras, D., J. R. O'Connor, P. M. Howarth, S. P. Sambol, G. P. Carter, T. Phumoonna, R. Poon, V. Adams, G. Vedantam, S. Johnson other authors (2009)**. "Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*." *Nature* **458**(7242), 1176-1179.
- O'Neil, H. S. & H. Marquis (2006)**. "*Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion." *Infection and immunity* **74**(12), 6675-6681.
- Ormonde, P., P. Horstedt, R. O'Toole & D. L. Milton (2000)**. "Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*." *Journal of bacteriology* **182**(8), 2326-2328.
- Purdy, D., T. A. O'Keefe, M. Elmore, M. Herbert, A. McLeod, M. Bokori-Brown, A. Ostrowski & N. P. Minton (2002)**. "Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier." *Molecular microbiology* **46**(2), 439-452.
- Rashid, M. H., N. N. Rao & A. Kornberg (2000)**. "Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens." *Journal of bacteriology* **182**(1), 225-227.
- Sambrook, J. & D. W. Russell (2001)**. *Molecular Cloning - a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour, Laboratory Press.
- Stabler, R. A., M. He, L. Dawson, M. Martin, E. Valiente, C. Corton, T. D. Lawley, M. Sebahia, M. A. Quail, G. Rose other authors (2009)**. "Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* O27 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium." *Genome Biol* **10**(9), R102.
- Tasteyre, A., M. C. Barc, A. Collignon, H. Boureau & T. Karjalainen (2001)**. "Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonisation." *Infect Immun* **69**(12), 7937-7940.
- Waligora, A. J., C. Hennequin, P. Mullany, P. Bourlioux, A. Collignon & T. Karjalainen (2001)**. "Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties." *Infection and immunity* **69**(4), 2144-2153.
- Wright, K. J., P. C. Seed & S. J. Hultgren (2005)**. "Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonisation." *Infection and immunity* **73**(11), 7657-7668.
- Young, G. M., D. H. Schmiel & V. L. Miller (1999)**. "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(11), 6456-6461.

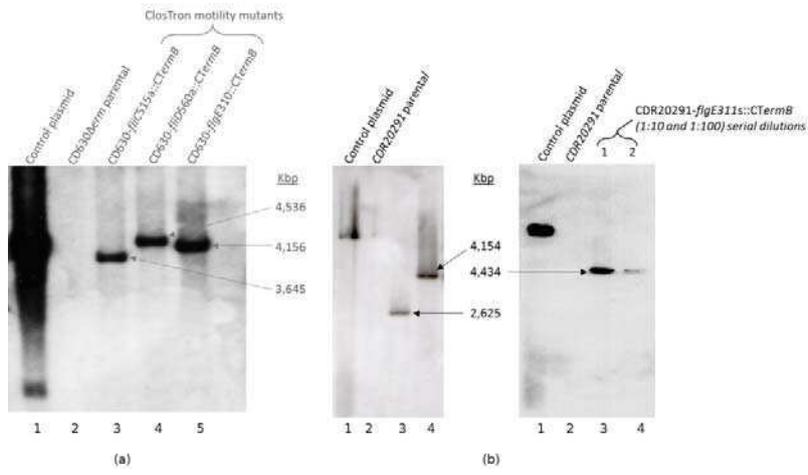


Figure 1.

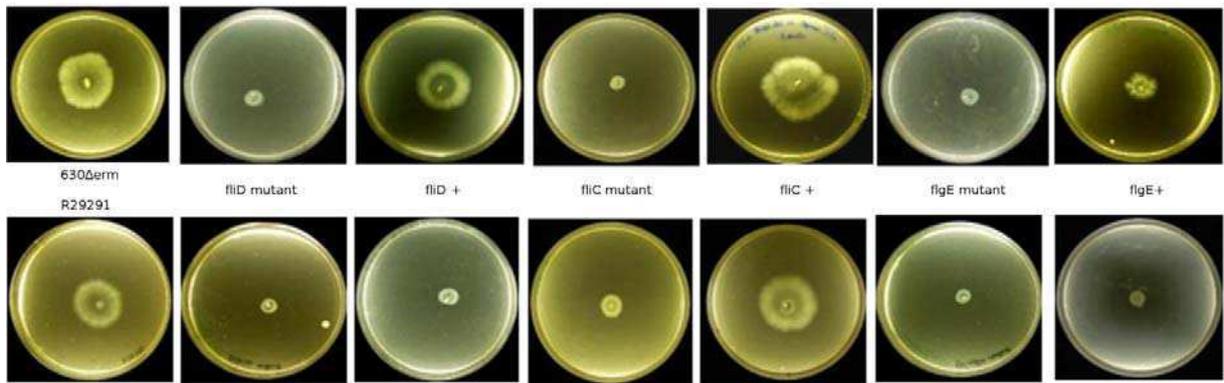


Figure 2A.

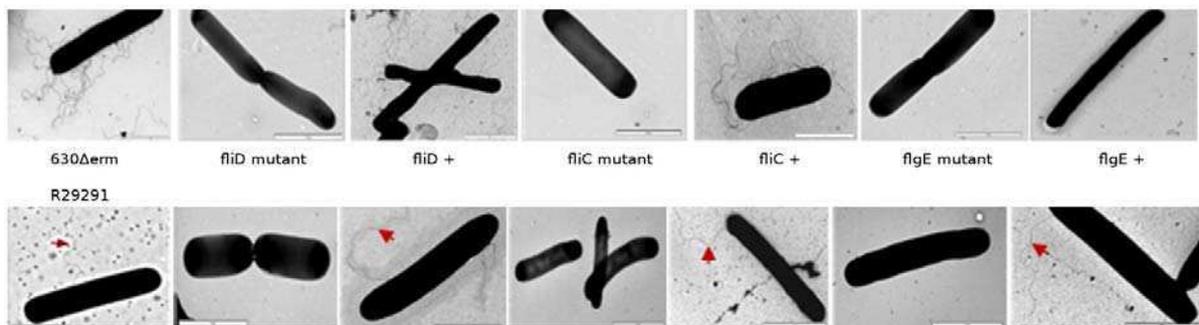


Figure 2B.

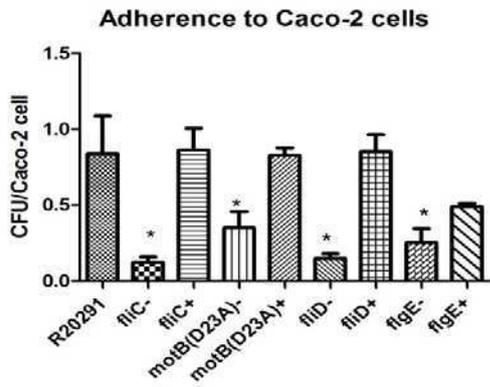


Figure 3.

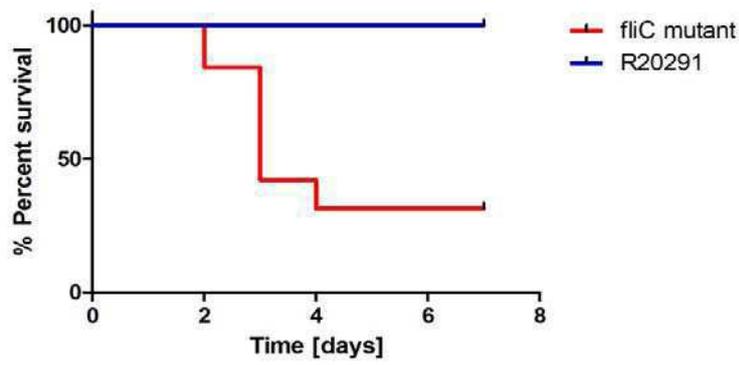


Figure 4A.

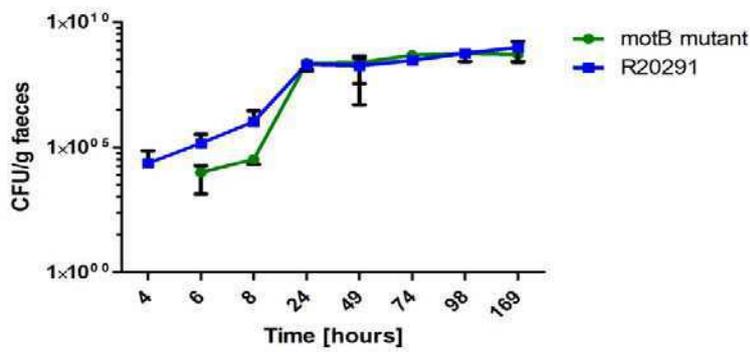


Figure 4B.

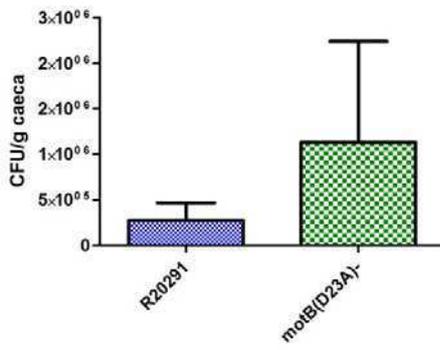


Figure 4C.

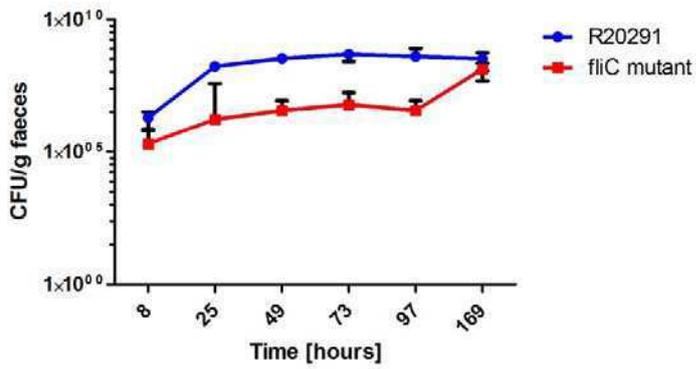


Figure 5A.

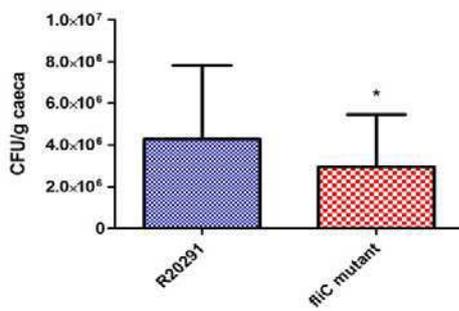


Figure 5B.

Supplementary data to

The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: Comparison of a non-epidemic and an epidemic strain.

Soza T. Baban¹, Sarah A. Kuehne¹, Amira Barketi-Klai², Kim R. Hardie¹, Imad Kansau², Anne Collignon², Nigel P. Minton^{1*}

TABLE S1. Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5' - 3')
CloStron primers:	
EBS universal	GTTTACTGAACGCAAGTTTCTAATTTTCG
ErmRAM-F	CCCCTATTATTATTTTTATCAATATA
ErmRAM-R	GCGACTCATAGAATTATTTCTCCCG
Cdi- <i>fliC</i> -515 516a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATTATCCTTGCAGTGCGCCC AGATAGGGTG
Cdi- <i>fliC</i> -515 516a -EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCTTGCAGT TAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>fliC</i> -515 516a -EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTATAATCCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>fliD</i> -560 561a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGTCTGCTTTCTTGTGCGCCC AGATAGGGTG
Cdi- <i>fliD</i> -560 561a-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCTTCTTGA TAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>fliD</i> -560 561a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTTCAGACTCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>flgE</i> -309 310s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGATACCTTCCAGTGCGCC CAGATAGGGTG
Cdi- <i>flgE</i> -309 310s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCTTCCAGT TAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>flgE</i> -309 310s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTATCCTCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>motA</i> -275 276a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACCTTCCTTTCTAGTGCGCCC AGATAGGGTG
Cdi- <i>motA</i> -275 276a- EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCTTCTAGC TAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>motA</i> -275 276a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGAAGTTCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>motB</i> -348 349s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGGATCTTACTAGTGCGCC CAGATAGGGTG
Cdi- <i>motB</i> -348 349s-	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCTTACTAGA

EBS1d	TAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>motB</i> -348 349s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTATCCCTCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>fliG</i> -663 664s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGAGTCTCTACCGTGCGCC CAGATAGGGTG
Cdi- <i>fliG</i> -663 664s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTCTACCTT TAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>fliG</i> -663 664s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTACTCCTCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>fliC</i> -429 430s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATCTACCGAAATAGTGCGCC CAGATAGGGTG
Cdi- <i>fliC</i> -429 430s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGAAATAA GTAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>fliC</i> -429 430s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGTAGATCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>fliD</i> -120 121s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAAACACGAACAAGTGCGCC CAGATAGGGTG
Cdi- <i>fliD</i> -120 121s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGAACAAC ATAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>fliD</i> -120 121s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTTGTTCGGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>flgE</i> -309 310s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGATACCTTCCAGTGCGCC CAGATAGGGTG
Cdi- <i>flgE</i> -309 310s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCTTCCAGT TAACTTACCTTTCTTTG
Cdi- <i>flgE</i> -309 310s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTTATCCTCGATAGAGGAA AGTGTCT
Cdi- <i>motB</i> -348 349s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGGATCTTACTAGTGCGCC CAGATAGGGTG
Cdi- <i>motB</i> -348 349s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTACTAGA TAACTTACCTTTCTTTGT
Cdi- <i>motB</i> -348 349s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTATCCCTCGATAGAGGAA AGTGTCT
<i>fliC</i> -515a-630-F	GCAGAAGGTTTCGTTAGAAGAACTGG
<i>fliC</i> -515a-630-R2	GCTTGAGCAAGCATTGATTGTGATGC
<i>fliD</i> -121s-630-F	CCAGTAAGAGTTACAGGCC
<i>fliD</i> -121s-630-R	CCAGCTGAGCCTTTTGCTAC
<i>fliD</i> -560a-630-F	CAACAGTTTCTCCAATGCTAGTGG
<i>fliD</i> -560a-630-R	CCTTGGTCATCAGTTACATCAGCTTC
<i>flgE</i> 310s-630-F	GTAATATATGCAAGTGCTCCAACAGC
<i>flgE</i> 310s-630-R-degenerate	GCTTTATATCCCCATCATAAATCAYACC
<i>motA</i> -275a-630-F	GCCGCAAAGGAAGTAGTTCAGGG

<i>motA</i> -275a-630-R	CCCAAAGCAGGTGCAAAGGTTCC
<i>motB</i> -348s-630-F	GGACAAGTATATTTAGTACGGG
<i>motB</i> -348s-630-R	CCCAATTGGATTCATGTGTACTTG
<i>fliG</i> -663s-CD630-F	GCACATATGGAACCAGAAAATGGGGC
<i>fliG</i> -663s-CD630-R	GCATCTGAAATCGCATCATCCACACC
<i>fliC</i> -430s-R20291-F	CCAAGCAGGAAGAAACGTTCAAGATGG
<i>fliC</i> -430s-R20291-R	GCTGCATCTGTTCCAGAAGTTCC
<i>fliD</i> -121s-R20291-F	GAGTTACAGGTCTTTCAGG
<i>fliD</i> -121s-R20291-R	GGAAGTGTCTGAACAATAGG
<i>motB</i> -348s-R20291-F	GGACAAGTATATTTAGTACGGG
<i>motB</i> -348s-R20291-R	CCCAATTGGATTCATGTGTACTTG
Spofdx-F1	GATGTAGATAGGATAATAGAATCCATAGAAAATATAGG
pMTL007-R1	AGGGTATCCCCAAGTTAGTGTTAAGTCTTGG
Mutant complementation	
M13-F	ACTGGCCGTCGTTTTACA
M13-R	CAGGAAACAGCTATG
<i>NotI</i> - <i>pfliC</i> -630-F	ACTGCGGCCGCAGTTATAGATTAAGTGTCCG
<i>XhoI</i> - <i>fliC</i> -630-R	GAATAAAAAAGAAAGGATAAGGCTTTGCCTCGAGGACAG
<i>NotI</i> - <i>pfliC</i> -R20291-F	CTGGCAGCGGCCGCGCTTACTAAACAAGTGAACAC
<i>NdeI</i> - <i>pfliC</i> - <i>fliD</i> -F-SOE	GGAGGGTAAAATACATATGTCAAGTATAAGTCCAG
<i>NdeI</i> - <i>pfliC</i> - <i>fliD</i> -R-SOE	CTATACTAAGGAGGGTAAAATACATATGTCAAGTATAAGTCC
<i>XhoI</i> - <i>fliD</i> -R	TATCTCGAGCATAATTAATTACCTTGTGCTTGTG
<i>NdeI</i> - <i>fliD</i> -F	ATACATATGTCAAGTATAAGTCCAGTAAGAG
<i>NdeI</i> - <i>pfliC</i> - <i>flgE</i> -R-SOE	GCTTTTATCATATGTATTTTACCCTCCTTAGTATAG
<i>NdeI</i> - <i>pfliC</i> - <i>flgE</i> -F-SOE	GGAGGGTAAAATACATATGATAAAAGCAATGTATTCAGG
<i>NdeI</i> - <i>flgE</i> -F	ATACATATGATAAAAGCAATGTATTCAGGTG
<i>XhoI</i> - <i>flgE</i> -R	TATCTCGAGCCTACTATCTCTTAAGATTTATTATTTT
<i>NdeI</i> - <i>motB</i> -F	ATACATATGGCGCGTAAAAAATAAGAAAAAGG
<i>XhoI</i> - <i>motB</i> -R	ATACTCGAGCCTCTTCCTCCTAGTCAATAG
<i>NdeI</i> - <i>pfliC</i> - <i>motB</i> -R-SOE	CGCGCCATATGTATTTTACCCTCCTTAGTATAG
<i>NdeI</i> - <i>pfliC</i> - <i>motB</i> -F-SOE	GGAGGGTAAAATACATATGGCGCGTAAAAAATAAG
<i>C. difficile</i> 630Δerm specific	
11870	GGATAGAAATACTCGTCAACAG
12870	ATTTTTATTTTTAGGAGTCATA

Figure S1. (A) Schematic representation of PCR screenings of putative integrants for detection of successful integration of the ClosTron into the target *fliC* gene. (i) PCR primers (*fliC*-F and *fliC*-R) are designed to anneal to genomic DNA sequence of wild-type *fliC* target gene; (ii) The chromosomal DNA of integrant clones with the ClosTron inserted into the target *fliC* gene in the anti-sense orientation showing the expected product sizes yielded by using the combinations of *fliC* gene-specific and intron-specific PCR screening primers. Primers are represented by green arrows.

(B) PCR screening analysis and confirmation of *fliC* mutant in *C. difficile* 630 Δ *erm* generated by ClosTron-targeted mutagenesis system. Lane M, NEB 2-Log DNA ladder (BioLabs); As controls, lane A, H₂O- negative control; lane B, *pMTL007C-E2:fliC-515a-CD630 Δ erm* retargeting plasmid; (C) Genomic DNA from wild-type *C. difficile* 630 Δ *erm* strain. (i) (1st junction); nonspecific binding of primers to the plasmid control, is occasionally noticed. This has previously been observed during development of the ClosTron knockout method (Heap et al., 2007), but does not affect interpretation of results. Lanes 1-11, erythromycin-resistant *C. difficile* integrant clones, (ii) (2nd junction), 2 and 3. (iii) Among eleven putative integrants screened, the clones in lanes 2, 5 and 11 are determined as *fliC* mutant clones compared to controls.

Figure S2 Construction of non-motile paralyzed-flagellated *motB* (D23A) point mutant. (A) Schematic representation of the chromosomal location of the annealing sites of the primers to generate the PCR product (500bp) in the wild-type and mutant strains. **(B)** Confirmatory PCR screening analysis of the candidate double crossover integrant clones for detection of the *motB* recombinant point mutant (clones 1 to 8). M, NEB 2-log DNA ladder marker (lane 1); H₂O-negative control (lane 2); PCR using wild-type *C. difficile* R20291 genomic DNA template as a positive control (lane 3).

Figure S3 Role of *C. difficile* 630 Δ *erm* flagella in in vivo mouse models (A) Kinetic of intestinal implantation by the *C. difficile* 630 Δ *erm* wild-type strain and non-motile non-flagellated *fliC* mutant. Human associated-microbiota mice (n=6) were inoculated with each of the two strains following antibiotic treatment to disrupt intestinal microbial flora and then the kinetic of intestinal implantation was monitored by analyzing faecal shedding during infection. Results are presented as the number of shed CFU bacteria per g of faeces, as described in Chapter 2. (B) Caecum colonization of wild-type strain and *fliC* mutant. Results are presented as number of adhered CFU bacteria obtained from caecal tissues of mice per g of caeca. (C) Kinetic of intestinal implantation by the *C. difficile* 630 Δ *erm* wild-type strain and non-motile non-flagellated *fliC* mutant. mono-axenic mice (n =6) were challenged with 1 x 10⁷ bacteria of single *C. difficile* strain. Faecal pellets were collected and processed at regular time intervals daily during a week to determine the kinetic of intestinal implantation for each of the two strains. Results are presented as the number of shed CFU bacteria per g of faeces, as described in Chapter 2. (D) Caecum colonization of motile flagellated *C. difficile* 630 Δ *erm* wild-type strain and non-motile non-flagellated *fliC* mutant of mono-axenic mice. The entire caecum of each mouse was collected at day 7 post-infection after euthanizing mice, and processed for determination of adherence level of each strain to the caecal tissues, as described in Chapter 2. Results are presented as the number of adhered *C. difficile* bacteria per g of caeca. Statistically significant difference is indicated by * for P < 0.05. (E) Rate of intestinal implantation by *C. difficile* 630 Δ *erm* wild-type strain and non-motile non-flagellated *fliC* mutant. Each mouse was co-challenged with the 2 strains and kinetic of intestinal implantation (faecal shedding) was measured by using the same protocol described for in the mono-axenic mice model, as described in

Chapter 2. (F) Caecal colonization of motile flagellated *C. difficile* R20291 wild-type strain and the non-motile non-flagellated *fliC* mutant. Statistically significant difference is presented by * for $P < 0.05$.

Figure S4 Vero cell cytotoxicity was affected by mutations in flagella associated genes in *C. difficile* 630. The level of toxins (toxin A and B mixture) was measured in culture supernatants of the *C. difficile* 630 Δ *erm* wild-type strain, the flagellar mutants (*fliD*, *fliC* and *flgE*) and complemented mutant strains during early exponential to late stationary growth phase of cell growth (8-50h), at 8 time-points. Vero cells were cultured to flat monolayer and exposed to *C. difficile* supernatants in 4 fold dilution series. After 24h incubation, toxin end-point titres were determined for each strain. The symbols represent the mean \pm standard deviation of three independent samples for each *C. difficile* strain.

Figure S5 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) analysis to assess *tcdA* expression in the flagellar structural mutants (*fliD*, *fliC* and *flgE*) compared to *C. difficile* 630 Δ *erm* wild-type strain. The toxin A (*tcdA*) mRNA expression at late exponential-early stationary growth phase, 16h growth time point. The *rpoA* mRNA was used as a reference. Each bar represents the average of two independent cultures. Error bars indicate the standard deviations. Asterics (*) refers to significantly different from the wild-type ($P < 0.05$).

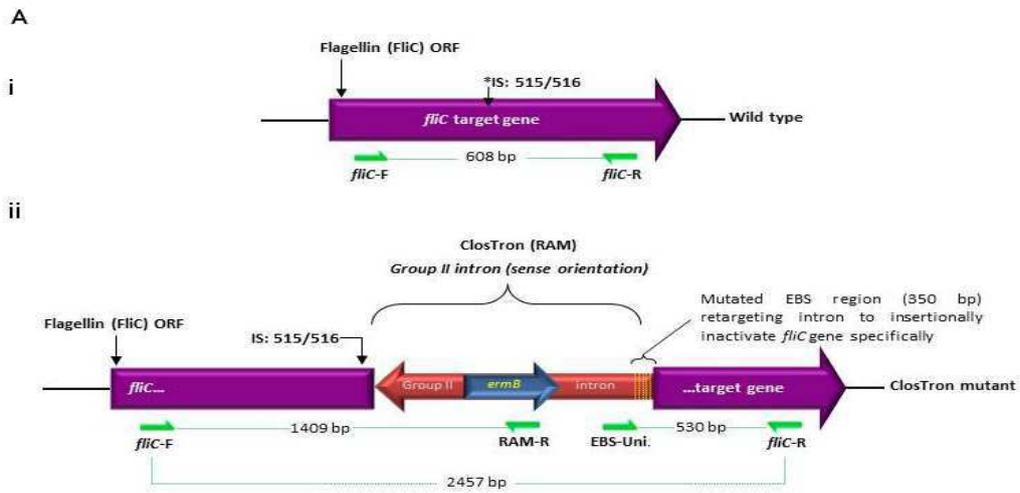


Figure S1. (A)

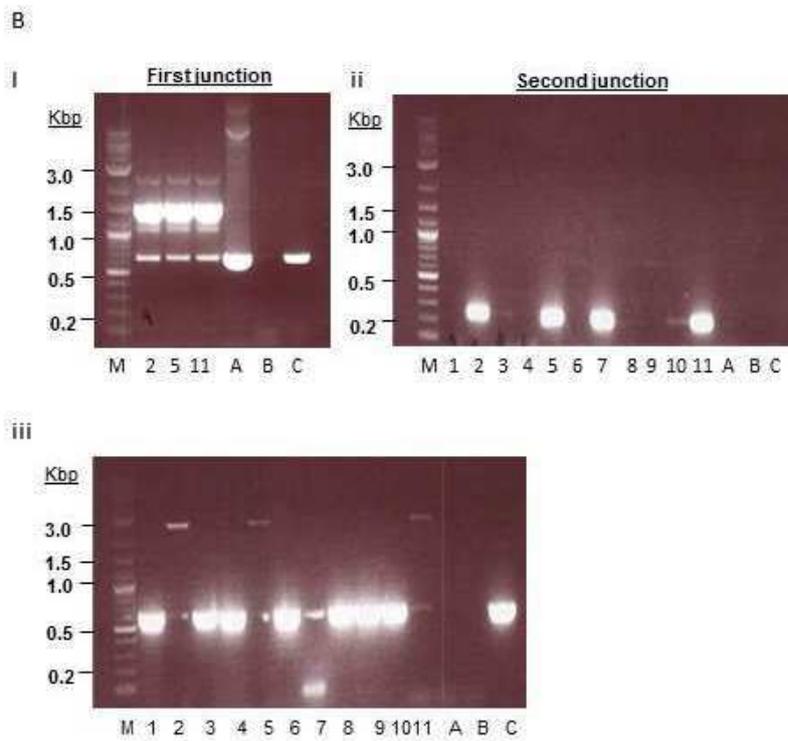


Figure S1. (B)

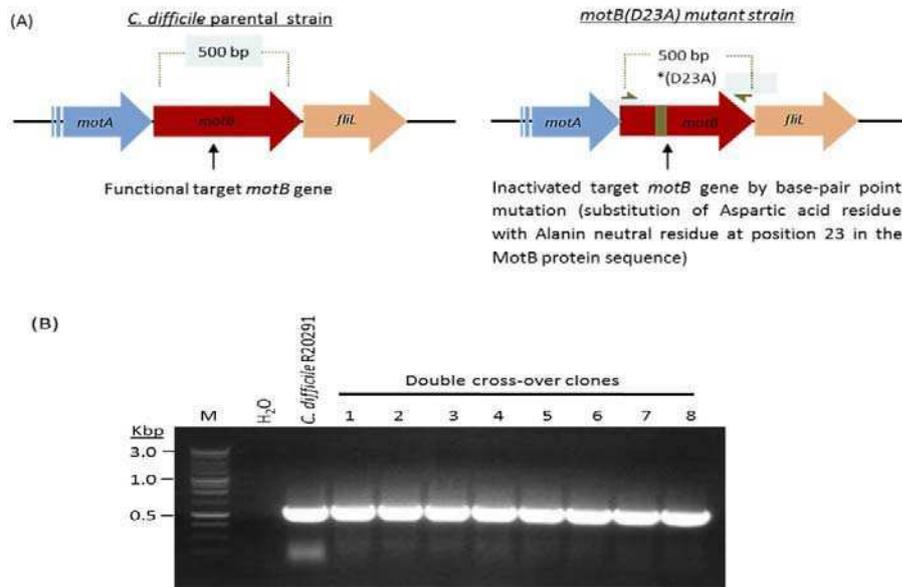


Figure S2.

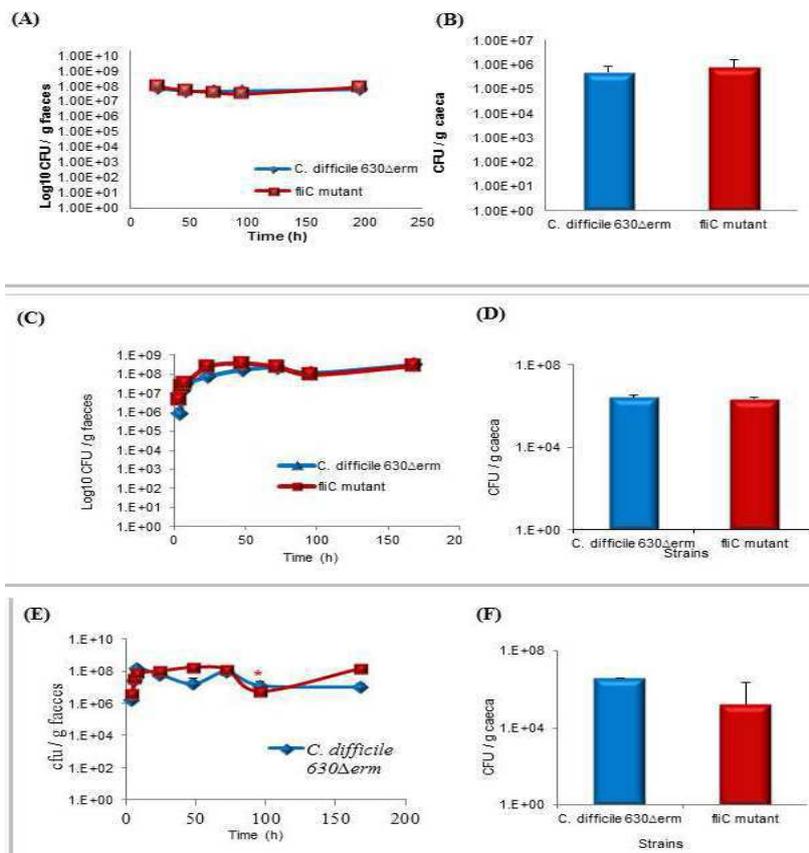


Figure S3.

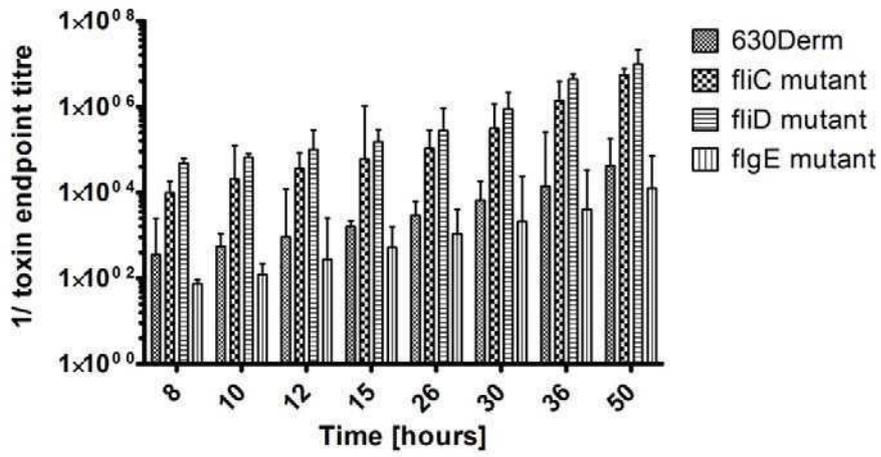


Figure S4.

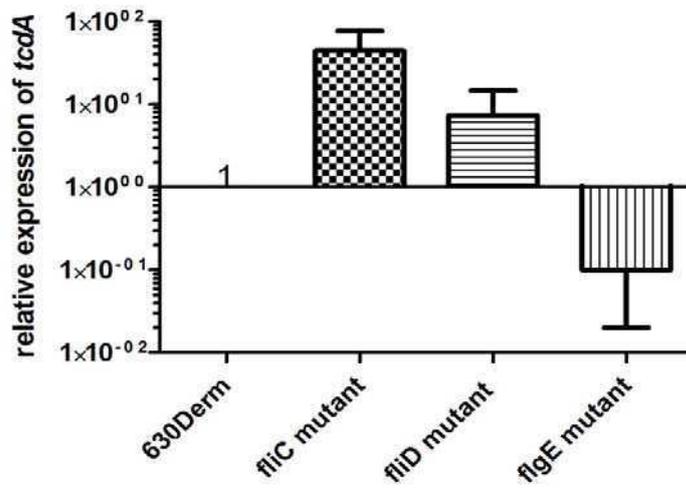


Figure S5.

II.2. Rôle de la flagelline, FliC, dans le processus de colonisation *in vivo*

II.2.1. Introduction

Les résultats obtenus précédemment suggèrent un rôle important de la flagelline FliC dans la pathogénèse de la souche 027 de *C. difficile*. Il est en effet étonnant de voir les souris succomber après infection par le mutant Δ FliC alors qu'il s'agit normalement d'un modèle faiblement sujet à la mortalité suite à une ICD. Le modèle de souris gnotoxéniques et plus particulièrement de souris monoxéniques a été développé pour étudier le processus de colonisation intestinale de *C. difficile*, ainsi que la production des toxines *in vivo* [381]. La morbidité et la mortalité associées à *C. difficile* dans ce type de modèle dépendent principalement du taux de production des toxines. De façon générale, un faible taux de mortalité est observé (< 2 %) sauf pour certaines souches hautement toxigènes [382]. La souche VPI 10463 est systématiquement associée à de forts dommages cellulaires et à 100 % de mortalité [383, 384, 385]. Une autre souche, la souche Mara isolée d'un adulte souffrant de colite pseudomembraneuse en France, provoque également la mort de toutes les souris infectées [384]. Par ailleurs, la colonisation par d'autres espèces bactériennes aux côtés de ces souches protège les souris et prévient leur mortalité [385, 386]. La mort d'environ 70 % des souris infectées par le mutant Δ FliC de la souche 027 suppose que cette souche est plus virulente que la souche sauvage 027 R20291, à laquelle aucun taux de mortalité n'a été associé.

Afin de comprendre l'origine de la virulence du mutant Δ FliC chez la souris gnotoxénique, nous nous sommes intéressés à l'analyse globale du transcriptome du mutant en comparaison à celui de la souche sauvage. Ceci devrait nous permettre de détecter des cibles potentielles impliquées dans cette virulence accrue.

Pour s'assurer de l'exactitude des résultats obtenus lors de ce premier essai de transcriptomique, le transcriptome de la souche complémentée FliC a été également analysé. Compte tenu du risque de perte du plasmide de complémentation *in vivo*, l'analyse a été réalisée *in vitro* par culture des trois souches sauvage, mutante et complémentée en milieu PY pendant 14 h. Pour éviter toute interférence en provenant du plasmide de complémentation, le plasmide natif (sans le gène *fliC*) a été introduit dans les deux souches mutante et sauvage.

Un autre aspect de la virulence de *C. difficile*, à savoir la sporulation, a été également étudié *in vitro* et *in vivo* pour les trois souches.

II.2.2. Matériels et méthodes

La démarche expérimentale suivie au cours de l'analyse transcriptomique du mutant Δ FliC *in vivo* est résumée dans la figure 28 et celle réalisée *in vitro* est décrite dans la figure 29.

II.2.2. 1. Souches bactériennes et conditions de culture

La souche utilisée au cours de cette étude est la souche R20291 de PR 027. Elle a été isolée en 2006 suite à une épidémie d'ICD à Stoke Mandeville en Angleterre [254]. La souche mutante Δ FliC a été construite dans la souche R20291 par l'équipe de Nigel Minton grâce à la technique du ClosTron. La souche complémentée a été, quant à elle, construite dans notre laboratoire grâce au plasmide de complémentation pMTL84151 fourni par l'équipe anglaise.

Les deux premières souches ont été cultivées sur gélose BHI (*Brain-Heart Infusion*) ou en bouillon PY (Peptone et extrait de levure, Difco) à 37°C en condition anaérobie (Chambre de Freter, Jacomex). La souche complémentée et les souches 027 et Δ FliC ayant reçu le plasmide de complémentation sans le gène *fliC* ont été cultivées dans le même type de milieux additionnés de 15 µg/ml de thiamphénicol.

Pour les essais de sporulation, les souches ont été cultivées en bouillon BHIS (BHI supplémenté avec 5 mg/ml d'extrait de levure (AES) et 0,1 % de L-Cystéine (Merck)) [284, 332]. Pour induire la germination des spores, les bactéries ont été ensemencées sur milieu BHIS additionné de 0,1 % taurocholate [282, 284].

Pour les essais de conjugaison, la souche d'*E. coli* HB101 (RP4) a été cultivée en milieu LB (*Luria-Bertani*) additionné de 100 µg/ml d'ampicilline et de 25 µg/ml chloramphénicol. Les transconjugants ont été cultivés sur gélose Columbia cystéinée enrichie en sang de cheval défibriné (4 %) et supplémentée en cyclosérine et céfoxitine (Oxoid).

II.2.2. 2. Infection des souris

L'essai a été réalisé sur 12 souris : six souris ont été infectées par la souche mutante Δ FliC et les 6 autres par la souche sauvage 027 R20291. Les souris utilisées sont des souris mâles C₃H/HeN âgées de 6-7 semaines (ANAXEM, France). Les suspensions de gavage ont été préparées à raison de 2×10^8 bactéries /ml à partir de cultures de 9 h en milieu PY (cultures en fin de phase exponentielle). Les souris ont été infectées par gavage oral avec 0,5 ml de suspension bactérienne, soit environ 10^8 bactéries / souris.

II.2.2. 3. Prélèvement et isolement des bactéries

Au bout de 14 h d'infection, les souris ont été sacrifiées et les caeca prélevés. Les caeca ont été immédiatement plongés dans 6 ml de solution RNA*Protect* (QIAGEN) afin de stabiliser les ARN puis incubés 15 min à température ambiante. Pendant l'incubation, les caeca ont été vidés de leurs contenus où se trouvent les bactéries luminales et leurs muqueuses ont été grattées afin de récupérer les bactéries adhérentes. Les caeca, ainsi que les contenants, ont été ensuite rincés par 1 ml de PBS pour récupérer le maximum de bactéries. L'ensemble de la solution obtenu a été grossièrement centrifugé (1 fois à 300 rpm pendant 1 min et une 2^e fois à 800 rpm pendant encore 1 min) afin d'éliminer les résidus fécaux et les plus gros débris. Une centrifugation à 4 300 rpm pendant 20 min a ensuite permis de sédimenter les bactéries. Le culot bactérien a été lavé avec 1 ml de PBS et puis conservé à -80°C jusqu'au moment de l'extraction de l'ARN.

II.2.2. 4. Dénombrement bactérien dans les contenus caeaux

Le dénombrement bactérien a été réalisé sur deux souris par souche et par expérience. Au moment du prélèvement bactérien, un aliquot de contenu caecal est récupéré, pesé et dilué dans du PBS jusqu'à l'obtention d'une concentration de 10 mg /ml. Suite à des dilutions en série, 100 μ l sontensemencés sur boîtes BHI pour le dénombrement des formes végétatives et sur boîtes BHI additionnées de 0,1 % taurocholate après choc alcoolique pour la numération des spores.

II.2.2. 5. Extraction des ARN totaux

Que ce soit à partir de cultures bactériennes (PY, 9 h) ou à partir des contenus caecaux, les ARN ont été extraits à l'aide du kit FastRNA Pro Blue (Q.BIOgene), selon les indications du fabricant. En résumé, les culots sont repris dans 1 ml de solution RNAproTM puis transférés dans un microtube de 2 ml contenant la matrice de lyse (« Lysing Matrix B »). La lyse bactérienne est ensuite obtenue par agitation rapide (40 sec, réglage 6) au FastPrep (BIO101 Thermo). L'ARN est isolé et purifié par extraction au chloroforme et par précipitation à l'éthanol (2 h à -20°C). L'ARN est enfin lavé, brièvement séché et repris dans 25 µl de tampon TE.

II.2.2. 6. Purification des ARN bactériens

Afin d'éliminer l'ARN eucaryote provenant des cellules caecales, l'ARN extrait est purifié grâce au kit MICROBEnrichTM (AMBION). Ce kit permet d'éliminer jusqu'à 90 % des ARN eucaryotes présents dans les échantillons. Son principe repose sur l'hybridation des ARNm polyadénylés et des ARNr eucaryotes 18S et 23S à des oligonucléotides couplés à des billes aimantées (figure 30). Les échantillons sont donc incubés pendant 1 heure à 37°C avec un mélange d'oligonucléotides de capture. L'ajout de billes aimantées couplées à des oligonucléotides capables de s'hybrider aux oligonucléotides de capture et aux extrémités 3' polyadénylés des ARNm eucaryotes permet de séparer l'ARN eucaryote de l'ARN bactérien (15 min à 37°C). L'ARN bactérien est retrouvé dans la solution liquide après capture des billes associées à l'ARN eucaryote à l'aide d'un portoir magnétique. L'ARN bactérien est enfin précipité à l'éthanol absolu pendant au moins 2 h à -20°C, lavé et repris dans 20 µl d'eau. L'ARN obtenu contient, en plus de l'ARN bactérien, les petits ARN eucaryotes (ARNr 5S et ARNt).

II.2.2. 7. Analyse de la qualité de l'ARN

L'ARN a été tout d'abord traité à la DNase (DNA-freeTM kit, Ambion). L'absence de contamination par l'ADN a été par la suite vérifiée par RT-PCR en temps réel sur les échantillons d'ARN en utilisant les amorces de *rpoA*, *gyrA* et *polIII*. L'absence d'expression témoigne de l'absence d'ADN dans les échantillons. Une autre RT-PCR quantitative a été

également réalisée sur les échantillons d'ADNc obtenus à partir des ARN. Cette analyse a permis de prouver la présence réelle d'ARNm dans les échantillons.

Les échantillons ont été également analysés au bioanalyseur (Agilent 2100) à l'aide du kit RNA 6000 Nano série II (Agilent). Le bioanalyseur permet la mesure du rapport ARNr 23S / ARNr 16S et le calcul du RIN (*RNA Integrity Number*) qui donne une appréciation sur la qualité globale de l'ARN. Les valeurs du RIN sont comprises entre 1 et 10, et plus les valeurs sont proches de 10 plus les échantillons sont de bonne qualité.

II.2.2. 8. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN, nécessaire pour l'hybridation sur les biopuces, a été extrait au phénol-chloroforme à partir de plusieurs cultures de 5 ml. Suite à la lyse bactérienne, l'ADN est mis au contact de 500 µl de phénol et de chloroforme 24 : alcool isoamylique 1 (volume / volume) et puis le surnageant est traité avec 400 µl de chloroforme. L'ADN est ensuite purifié et précipité par de l'acétate de sodium 3M et par de l'éthanol absolu pendant 1 heure à -20°C. Le culot est enfin lavé à l'éthanol 70 % et dissout dans 120 µl d'eau. La qualité de l'ADNg obtenu est évaluée par migration sur gel d'agarose 1 % et sa quantité est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm au spectrophotomètre. Les mesures de DO à 280 nm et à 230 nm permettent également de déterminer les rapports de DO_{260}/DO_{280} et de DO_{260}/DO_{230} qui reflètent respectivement l'état de contamination en protéines et en sels. Il est recommandé d'avoir des rapports proches de 2.

II.2.2. 9. Marquage de l'ADN génomique

Le marquage indirect de l'ADN, utilisé comme référence technique, a été réalisé par le kit *Bioprime plus array CGH indirect genomic labeling system* (Invitrogen). Quatre µg d'ADN sont d'abord marqués par l'aminohexylacrylamido-dUTP (aha-dUTP) et purifiés selon les indications du fabricant. L'ADN est par la suite couplé aux *Dyes* fluorescents pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Il est enfin re-purifié et dosé au Nanodrop.

II.2.2. 10. Transcription et marquage de l'ADNc

Le marquage se fait au moment de la transcription de l'ARN en ADNc. Il est obtenu grâce au kit Superscript Indirect cDNA labelling (Invitrogen). Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir de 5 µg d'ARN en incubant 5 min à 70°C avec des amorces aléatoires p(dN)₆ (Roche) et puis 3 h à 42°C avec le tampon d'hybridation, DTT 0,1M, les dNTP et les enzymes Superscript III RT (400 U/µl) et RNase OUT (40 U/µl). L'ARN de départ est ensuite dégradé par hydrolyse alcaline et l'ADNc simple brin est purifié à l'aide de colonnes fournies par le kit. L'ADNc est précipité toute la nuit à -20°C avec l'acétate de sodium 3M, l'éthanol absolu et 20 mg/ml de glycogène. Après lavage le lendemain, l'ADNc est marqué soit en vert par la Cyanine 3 soit en rouge par la Cyanine 5 (GE Healthcare) pendant 1 heure à l'obscurité, puis purifié à l'aide de colonnes de purification. Le marquage a été réalisé selon le principe du « Dye Switch » (figure 31). Contrairement au système « Dye swap » nécessitant le marquage de chaque échantillon par les deux fluorophores, le « Dye switch » permet le marquage des échantillons deux à deux (deux réplicats biologiques sont donc marqués au Cy3 et les 2 autres sont marqués au Cy5).

II.2.2. 11. Design des biopuces

Les biopuces utilisées dans cette étude sont des biopuces Agilent à base d'oligonucléotides simples brins (45-60 pb). En comparaison aux produits PCR utilisés sur certaines biopuces, les oligonucléotides fluorescent beaucoup moins, minimisant ainsi « l'effet Dye » qui apporte un bruit de fond et un risque d'erreur à l'analyse. Chaque gène est représenté par 1, 2 ou 3 oligonucléotides sur la biopuce et chaque oligonucléotide est « spoté » deux fois sur la lame de manière aléatoire. Les oligonucléotides ont été dessinés à l'aide du logiciel OligoArray 2.0. Sur un total de 3552 gènes du génome de la souche R20291 (EMBL database), 3511 gènes ont pu être représentés sur la biopuce (41 gènes ne sont donc pas présents sur la biopuce). Ces gènes sont représentés par 7157 oligonucléotides différents dont 6928 ont une taille comprise entre 55 et 60 pb et 229 ont une taille de 45-50 pb. De manière générale, plus l'oligonucléotide est grand en terme de taille, plus il est efficace en hybridation spécifique. Cinq

cent trente six (536) contrôles positifs et 894 contrôles négatifs ont été également inclus sur la biopuce. Les caractéristiques de la biopuce sont résumées dans le tableau I.

II.2.2. 12. Hybridation des biopuces

Chaque biopuce est hybridée simultanément avec 200 pmol d'ADNc et 200 pmol d'ADNg marqués différemment (Cyanine-3 ou Cyanine-5) (figure 32, [387]). Pour l'analyse transcriptomique *in vitro*, l'ADNc des échantillons du mutant Δ FliC ainsi que celui de la souche complétée ont été hybridés contre l'ADNc de la souche sauvage 027 marqué d'une autre couleur.

Un volume total de 20 μ l est recommandé pour une bonne hybridation. Ce volume a été ajusté par séchage au SpeedVac en fonction des concentrations des différents échantillons. Le mélange des deux échantillons est additionné de 5 μ l de solution de blocage 10 X et de 25 μ l de tampon d'hybridation GEx 2 X, et il est chauffé à 95°C pendant 2 min. Le tout est délicatement mis sur la biopuce et est inséré dans une cassette étanche. L'hybridation s'est faite pendant 17 h à 65°C.

A la fin de l'hybridation, la biopuce est lavée dans trois bains successifs (Agilent) puis elle est brièvement séchée et scannée avec GenePix Pro 6 (à 635 nm pour le dosage de la couleur rouge induite par le fluorophore Cy5 et à 532 nm pour la lecture de la couleur verte émise par le fluorophore Cy3).

II.2.2. 13. Analyse des résultats des biopuces

Le traitement des données a été réalisé par l'ingénieur Marc Monot de l'Institut Pasteur de Paris. Les résultats ont été analysés avec le logiciel R et le package Limma (*Linear model for Microarray Data*) (www.bioconductor.org) et normalisés selon la méthode de Loess [388]. L'identification des gènes différentiellement exprimés a été réalisée grâce à une analyse statistique en *t*-test selon un modèle Bayésien et grâce à la correction de Benjamini et Hochberg. La différence d'expression d'un gène est considérée significative quand le risque d'erreur $p < 0,05$.

L'analyse globale des résultats découlant des biopuces est ensuite réalisée à l'aide du programme MA2HTML mis au point par l'ingénieur Marc Monot de l'Institut Pasteur de Paris. Ce programme permet de visualiser les différents gènes variables et de les classer en groupes selon leur rapport d'expression et selon leur intérêt dans l'analyse. Les gènes présentant un rapport d'expression supérieur ou égal à 2 ont été retenus pour cette analyse.

II.2.2. 14. Validation des données des biopuces par RT-PCR en temps réel

Afin de confirmer les résultats obtenus par les biopuces, il est nécessaire de vérifier l'expression relative de certains gènes par RT-PCR en temps réel. Pour ce faire, 1 µg d'ARN a été transcrit en ADNc à l'aide du kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen). La RT-PCR en temps réel a été ensuite réalisée en triplicat dans un volume final de 10 µl comprenant 4 ng d'ADNc, 5 µl du supermix SSo AdvancedTM SYBR Green (BIO-RAD) et 500 nM d'amorces spécifiques. Les réactions ont été effectuées dans la machine CFX 96 Real-time system (BIO-RAD) en utilisant le logiciel CFX ManagerTM version 1.5 (BIO-RAD). Le programme thermique inclut une phase d'activation à 95°C pendant 3 secondes et 40 cycles de 95°C pendant 2 min et 60°C pendant 5 min. Une phase supplémentaire est rajoutée à la fin du programme (de 65°C à 95°C, 0,5°C/0,5 s) pour permettre l'établissement d'une courbe de fusion qui déterminera la spécificité des couples d'amorces utilisés. Chaque essai inclue une courbe standard de 8 dilutions successives à partir d'un mélange des différents échantillons d'ADNc (gamme de 10 ng à 1.6 pg, dilutions au 1/3) et un contrôle négatif (eau). Les couples d'amorces utilisés (annexe II) présentent tous une efficacité supérieure à 95 %. Les résultats ont été normalisés par rapport à la moyenne géométrique de 4 gènes de référence (*polIII*, *16S*, *rpoA* et *gyrA*). Ces gènes de référence ont été sélectionnés par le programme GeNorm^{PLUS} (<http://www.biogazelle.com>) à partir de 6 gènes de référence (tableau II). Les quantités relatives normalisées ont été calculées selon la méthode $\Delta\Delta C_T$ [389, 390] puis analysées statistiquement par la technique de Mann et Whitney (programme StatEL). Une différence d'expression est considérée significative au risque d'erreur $p < 0,05$.

II.2.2. 14. Capacité de sporulation *in vivo*

La capacité de sporulation des souches Δ FliC et 027 R20291 a été comparée *in vivo*. Des souris axéniques ont été inoculées avec 10^8 bactéries / souris à partir de cultures de 9 h en milieu PY. Après 14 h d'infection, les fèces des souris ont été récupérées, pesées et diluées en PBS jusqu'à une concentration de 10 mg fèces/ml. Cinq cent microlitres de cette suspension sont additionnés d'un volume équivalent d'alcool absolu (choc alcoolique) pour éliminer les formes végétatives. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, le culot est repris dans 500 μ l de PBS et dilué en série avec du PBS. Ces dilutions ont étéensemencées sur boîtes BHIS additionnées de 0,1 % de taurocholate pour favoriser la germination des spores. Les boîtes ont été ensuite cultivées à 37°C en anaérobiose pendant 48 h. Les résultats obtenus sont représentés en nombre de spores par gramme de fèces.

Après prélèvement des fèces, les souris ont été sacrifiées afin de récupérer leurs caeca. Ces derniers ont été vidés de leurs contenus par 8 lavages successifs dans des bains de 10 ml de PBS. Les caeca lavés et égouttés ont été pesés et dilués dans du PBS à raison de 10 mg caeca/ml. Ils ont ensuite été broyés par un Ultra-Turrax (IKA-labortechnik) pendant 1 min à 13 500 rpm dans la glace. Les broyats contenant les bactéries et les spores adhérentes aux caeca ont été dilués en série etensemencés sur milieu BHIS + 0,1 % taurocholate après choc alcoolique (pour le dénombrement des spores) et parallèlement sur milieu BHI (pour le dénombrement des formes végétatives).

II.2.2. 14. Cinétique de sporulation *in vitro*

La cinétique de sporulation des trois souches sauvage R20291, mutante Δ FliC et complémentée a été réalisée sur des cultures en milieu BHIS (en triplicate pour chaque souche). Afin de minimiser le nombre de spores dans les suspensions de départ, deux inocula successifs ont été utilisés : le premier inoculum a été préparé à partir de colonies sur boîtes et a été cultivé durant toute la nuit, le deuxième inoculum a été préparé par dilution au 1/100 du premier inoculum et il a été cultivé pendant 9 h. La suspension finale est obtenue par dilution au 1/100 de cette culture. La détermination du nombre de spores par suspension a été réalisée tous les jours

pendant une semaine. Le nombre de formes végétatives a été également déterminé en parallèle afin d'évaluer la capacité de sporulation en nombre de spores par nombre de cellules totales.

II.2.2. 15. Construction de la souche complétée de *FliC*

Pour compléter la souche mutante Δ *FliC*, nous avons utilisé le plasmide pMTL84151 contenant le gène *fliC* gracieusement donné par l'équipe de Nigel Minton. Le plasmide a été introduit dans la souche Δ *FliC* par conjugaison en utilisant *E. coli* HB101 (RP4) comme donneur. La sélection a été faite sur la résistance au thiamphénicol (15 μ g/ml). La présence du plasmide a été réalisée par PCR et par vérification de la capacité de mobilité dans un milieu semi-solide en tube (BHI 0,4 % d'agar).

Le même plasmide pMTL84151 sans le gène *fliC* a été également introduit dans les souches sauvage 027 et mutante Δ *FliC* afin de s'affranchir de tout effet pouvant provenir de ce plasmide. L'analyse transcriptomique *in vitro* a été donc réalisée sur ces deux souches en plus de la souche complétée.

II.2.3. Résultats et discussion

II.2.3. 1. Analyse transcriptomique *in vivo* du mutant Δ *FliC*

L'extraction des ARN totaux a été réalisée sur des bactéries isolées à partir de six souris. Les quatre meilleurs ARN ont été choisis pour le reste de l'étude sur la base de leurs quantités respectives et leurs caractéristiques qualitatives (RIN > 6,5, dégradation faible, quasi absence de contamination par l'ADN génomique, présence effective d'ARNm) (tableau III). Un exemple des profils de bioanalyseur obtenus est présenté dans la figure 33. La méthode d'extraction et surtout la méthode de purification des ARN utilisées nous ont permis d'avoir des échantillons plutôt de bonne qualité, malgré les difficultés d'extraction *in vivo* et les multitudes de traitements subits par l'ARN. La quantité d'ARN obtenue n'est cependant pas très importante. D'ailleurs, le taux de marquage obtenu par la suite était inférieur à celui espéré, mais cela ne nous pas empêché de mener à bien l'hybridation. La qualité des puces à ADN, ainsi que les différentes

étapes de normalisation et de correction prévues ont rendu possible l'utilisation de ces échantillons pour la suite de l'étude.

L'analyse globale du transcriptome, après normalisation et analyse statistique, montre une expression différentielle pour 310 gènes (annexe III) dont 179 sont surexprimés et 131 sont sous-exprimés chez le mutant Δ FliC par rapport à la souche sauvage 027. Les principaux gènes différentiellement exprimés sont des gènes impliqués dans le transport membranaire (32 gènes), la régulation (21 gènes), la sporulation (9 gènes), la réponse au stress (7 gènes), ainsi que des gènes codant certains facteurs de virulence et quelques protéines de membrane et de surface (figure 34).

La confirmation des résultats obtenus par les biopuces, au moyen de la RT-PCR en temps réel, montre que 76 % des gènes analysés atteignent le même niveau d'expression que celui constaté sur la biopuce. Au total, 25 gènes jugés intéressants pour l'analyse ont été testés en RT-PCR en temps réel et cinq d'entre eux n'ont pas été confirmés quant à leur variation (tableau IV). Les cinq gènes non confirmés sont des gènes codant des protéines de surface (*cwp66*, *fbpA*, *cwp84* et *groEl*), ainsi que les deux gènes de toxines *tcdA* et *tcdB*. Les résultats de RT-PCR en temps réel ont été obtenus par analyse de l'expression de quatre échantillons différents par souche (4 réplicats biologiques), chacun ayant été testé trois fois (triplicat technique). Leurs expressions relatives ont été calculées par la méthode $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ sur la base de la moyenne géométrique des niveaux d'expression de quatre gènes de référence différents (*gyrA*, *rpoA*, *polIII* et *16S*). Ces gènes de référence ont été sélectionnés par le programme GeNorm^{PLUS} parmi un total de six gènes de référence (*gyrA*, *rpoA*, *polIII*, *16S*, *GluD* et *rpsJ*) (figure 35).

L'analyse détaillée de l'ensemble des gènes différentiellement variables dans les deux souches 027 et Δ FliC montre l'implication de plusieurs groupes de gènes en relation avec la virulence de *C. difficile* et sa capacité d'adaptation et de survie dans le tractus digestif de l'hôte. L'expression d'autres gènes codant des éléments mobiles ou des protéines à fonction inconnues est également fortement modifiée. Tous ces gènes touchés directement ou indirectement par l'inactivation du gène *fliC* et/ou l'absence de la protéine FliC sont donc des candidats intéressants qui peuvent expliquer la virulence accrue du mutant Δ FliC et qui peuvent servir à moyen et long terme de cibles potentielles pour la lutte contre les infections à *C. difficile*.

Les groupes de gènes ayant présenté d'importantes variations d'expression sont décrits ci-dessous par famille de gènes.

- **Les gènes de protéines de surface**

L'expression de quelques gènes codant des protéines de surface est modifiée suite à la mutation du gène *fliC*. Selon les résultats des biopuces, l'expression de deux gènes de protéines paralogues à la protéine SlpA, *cwp28* et *cwp66*, est augmentée dans la souche mutante Δ FliC. L'analyse par RT-PCR en temps réel montre cependant une expression différente, à savoir une diminution de l'expression du gène *cwp66* plutôt qu'une augmentation comme cela a été constaté avec la biopuce. Les gènes codant d'autres protéines de surface (*cwp84*, *fbpA* et *groEL*) semblent aussi être affectés de la même manière (diminution de l'expression chez le mutant Δ FliC). Une faible expression de ces gènes à un taux inférieur au seuil de détection par la biopuce (correspondant au bruit de fond) pourrait expliquer l'absence de détection d'une telle variation. Cette diminution de l'expression des gènes d'adhésines pourrait se traduire par un plus faible pouvoir d'adhésion aux cellules hôtes. Les gènes de ces protéines adhésives ainsi que ceux des flagelles sont donc régulés de la même manière et interviennent ensemble au moment de la colonisation.

Un autre gène codant une hémagglutinine putative (CDR0440) est également fortement sous-exprimé chez le mutant Δ FliC (9 fois moins exprimé). Ce gène a été identifié comme un des gènes spécifiques aux souches de PR 027 (CD196 et R20291) et la protéine correspondante a été spécifiquement retrouvée dans le sécrétome des souches 027 R20291 et CD196 en milieu BHI [254, 391], ce qui suggère que cette protéine joue probablement un rôle important dans la pathogénèse de la souche 027 et que ce rôle est, à priori, en liaison avec la flagelline FliC.

De plus, le gène CDR3350 codant la piline, protéine constitutive du pilus de type IV, est exprimé environ 4 fois plus chez le mutant Δ FliC. Les pili ont été impliqués dans plusieurs fonctions liées à la pathogénicité bactérienne. Ils interviennent en effet dans les échanges génétiques par conjugaison et dans la sécrétion et la capture de certaines macromolécules pouvant être des facteurs de virulence [392, 393]. Ils ont été également associés au phénomène d'adhésion, à la formation de biofilms et surtout à la mobilité bactérienne par glissement sur des

surfaces solides [394, 395, 396, 397]. Il se peut donc que la souche mutante fasse appel à ses pili pour faire face au manque de mobilité induit par la mutation de *fliC*.

D'autres gènes de protéines piliées (CDR0019, CDR0043-44, CDR2128 et CDR2235) ainsi qu'un gène d'une lipoprotéine (CDR2092) et un gène d'hydrolase (CDR2089) sont aussi surexprimés chez le mutant Δ FliC. Les produits de ces gènes pourraient éventuellement avoir un rôle dans les processus d'adhésion et de colonisation de *C. difficile*, ou dans son processus de virulence. La lipoprotéine a été d'ailleurs particulièrement étudiée chez d'autres bactéries et a été associée au processus d'adhésion et de virulence de plusieurs pathogènes [398].

- **Les gènes de protéines flagellaires**

Chez *C. difficile*, les gènes impliqués dans la biosynthèse et le fonctionnement des flagelles sont regroupés dans deux loci F1 et F3 qui sont séparés par le locus F2 dont les gènes sont impliqués dans la glycosylation des protéines flagellaires [194, 254]. Cette glycosylation pourrait avoir un rôle dans l'assemblage des différents composants des flagelles et dans les réactions hôte-pathogène [399].

L'absence d'expression du gène *fliC* s'accompagne de la sous-expression de plusieurs gènes codant des protéines flagellaires dont la plupart font partie du locus F3. Sept autres gènes sont par ailleurs surexprimés. Le gène le plus fortement surexprimé est celui codant la protéine de coiffe FliD. Ce résultat est en parfaite corrélation avec des résultats déjà obtenus sur des mutants Δ FliC et Δ FliD construits dans la souche 630 Δ erm [193]. Les auteurs ont effectivement montré que le mutant Δ FliC produit une plus grande quantité de protéine FliD et qu'inversement le mutant Δ FliD est incapable de produire la protéine FliC. La protéine de coiffe FliD serait donc produite en présence ou en absence de flagelline FliC mais cette dernière ne pourrait pas être produite en absence de FliD. Ceci suggère que FliD exercerait un effet positif sur l'expression de *fliC*. En contre partie, l'expression de FliD est atténuée quand FliC est exprimé en trans dans un plasmide, ce qui suppose que FliC pourrait réprimer l'expression du gène *fliD* [193]. Ces résultats, ainsi que les nôtres, indiquent que la régulation des deux protéines pourrait bien être interdépendante.

Le locus F2 dont les produits des gènes sont responsables de la glycosylation des protéines flagellaires est également touché par la mutation de *fliC*. Ce locus est sensiblement différent entre les souches 630 et 027 R20291. Il comprend six gènes différents chez la souche 027 R20291 (CDR0242-47) et seulement quatre gènes chez la souche 630 (CD0241-44) [254]. Les deux gènes supplémentaires dans la souche 027 R20291 (CDR0243-44) codant respectivement une glycosyl transférase et une protéine hypothétique sont surexprimés chez le mutant Δ FliC.

- **Les gènes de la régulation**

L'expression de plusieurs régulateurs a été modifiée suite à l'inactivation du gène *fliC* (annexe III). Il est possible que certains de ces régulateurs soient responsables, par l'intermédiaire de la flagelline, de la régulation du processus de synthèse des flagelles ou d'un ou plusieurs autres processus associés à la production des flagelles.

Parmi ces régulateurs, le régulateur *agr2* (CDR3187-89) est 3 à 4 fois plus exprimé chez le mutant Δ FliC. Ce taux d'expression a été vérifié par RT-PCR en temps réel et il a été évalué à 4,26 (tableau IV). Le locus *agr2* a été spécifiquement identifié chez des souches hypervirulentes de PR 027 [254]. Une étude plus récente montre néanmoins que ce locus est présent dans 84 % des souches de *C. difficile*, parmi lesquelles il y aurait des souches non toxigènes [315].

Le système *agr* est un système de communication bactérienne couramment appelé système de « quorum sensing ». Il repose sur la capacité des bactéries à détecter des petites molécules dites « auto-inducteurs » ou « phéromones » en cas de forte densité bactérienne. Ces molécules interagissent avec des facteurs de transcription spécifiques et activent de ce fait un gène particulier. Ceci induit la production d'un signal permettant aux bactéries d'adapter leurs comportements. Le système *agr* a été décrit chez beaucoup de pathogènes comme un régulateur de facteurs de virulence et comme un inducteur pour la formation de biofilms. Cependant, aucune étude précisant son rôle dans la pathogénicité de *C. difficile* n'a encore été publiée. Il se peut néanmoins qu'il y ait un lien entre le système de quorum sensing et la mobilité de *C. difficile* comme cela a été décrit chez *Edwardsiella tarda*, chez qui l'expression de la flagelline FliC est négativement régulée par un système de quorum sensing [400].

Le gène codant un facteur sigma 70, de la famille ECF (*ExtraCytoplasmic Function*) responsable de la réponse au stress extracellulaire et de la résistance aux peptides antimicrobiens, est également assez fortement surexprimé chez le mutant Δ FliC (x 5). Il s'agit du facteur sigma CsfT codé par le gène CDR0676 [296]. L'implication de ce type de facteur sigma ainsi que des protéases régulant leur transcription dans la virulence a été établi chez plusieurs pathogènes comme *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Mycobacterium tuberculosis* [401 , 402 , 403 , 404 , 405]. Chez *C. difficile*, ces facteurs sigma semblent jouer un rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens et dans la colonisation du tractus gastro-intestinal [296]. Ce rôle dans la colonisation pourrait donc être lié aux flagelles.

Trois gènes codant des histidine kinases, faisant probablement partie des systèmes de régulation à deux composants, sont différemment exprimés chez le mutant Δ FliC. Par définition, un système à deux composants permet la transduction de signal par voie de phosphorylation. Comme son nom l'indique, le système à deux composants implique deux partenaires : une histidine protéine kinase membranaire (HK) qui perçoit un stimulus environnemental et un régulateur de réponse cytoplasmique (RR) qui déclenche une réponse appropriée au signal perçu. En présence du stimulus, l'HK, également appelée « protéine senseur », s'auto-phosphoryle et le groupement phosphate est ensuite transféré de façon spécifique vers le régulateur RR associé. Le RR ainsi phosphorylé va pouvoir jouer son rôle d'effecteur et déclencher une réponse adaptée au stimulus perçu. La plupart des RR sont des facteurs de transcription qui modifient l'expression de gènes cibles, favorisant ainsi l'adaptation de la bactérie aux conditions environnementales rencontrées. De façon générale, ces systèmes contrôlent l'expression de gènes impliqués dans des fonctions cellulaires importantes telles que l'acquisition de nutriments, la division cellulaire, les fonctions de virulence ou encore les systèmes de résistance aux antibiotiques [406 , 407].

Un des gènes des histidines kinases (CDR1476, 2,67 fois plus exprimé chez le mutant) code une HK qui phosphoryle la protéine Spo0A, premier maillon de la chaîne de sporulation. Le rôle des deux autres HK dont les gènes sont différentiellement exprimés est encore inconnu ; mais l'une d'entre elles (codée par CDR2760) semble être spécifiquement présente chez les souches de PR 027 (CD196 et R20291) [254].

En plus de ces gènes d'histidine kinases, plusieurs gènes de régulateurs transcriptionnels ont vu leur expression changée suite à la mutation du gène *fliC*. Au total cinq régulateurs transcriptionnels sont sous-exprimés et douze sont surexprimés. Un de ces régulateurs (CDR1105, exprimé 5,6 x plus chez le mutant) a été décrit comme un marqueur génétique de virulence associé à des infections sévères causées par des souches de type NAP1 [316]. Deux autres régulateurs (CDR3469 et CDR2964, tous deux surexprimés chez le mutant Δ FliC) ont été aussi spécifiquement associés aux souches de PR 027 [254]. Le premier code un régulateur de la famille TetR impliqué dans la résistance à la tetracycline et le deuxième code un régulateur apparenté à la famille PadR qui régule le métabolisme des acides phénoliques. L'utilisation de l'acide phénolique en tant que source d'énergie pourrait être un bon moyen de survie pour la bactérie dans son environnement gastro-intestinal.

Les autres régulateurs sont associés à différentes familles dont la famille AraC (rôle dans la dégradation de l'arabinose), LysR (biosynthèse de la Lysine), GntR (catabolisme du gluconate) ou encore Fur (régulation du fer).

Visiblement, le nombre et la nature des régulateurs affectés par la mutation de *fliC* sont nombreux. Cela traduit sans doute un état de stress total au niveau de la bactérie ; et vu le caractère pléiotrope de la plupart d'entre eux, il est tout à fait envisageable qu'ils puissent intervenir à différents niveaux des processus cellulaires bactériens. D'ailleurs, certaines de ces familles de régulateurs ont été déjà associées à la virulence, à l'adhésion et à la mobilité bactérienne [408 , 409].

- **Les gènes de résistance aux antibiotiques**

De manière surprenante, l'expression de trois gènes de résistance au chloramphénicol (CDR3461), à la streptogramine A (CDR2125) et au lantibiotique (CDR0567-68) est affectée par la mutation de FliC. Il est important de signaler que le gène de résistance au chloramphénicol est porté par un transposon conjugatif spécifique à la souche 027. Ce transposon, plutôt connu sous le nom de CTn027, est actuellement nommé Tn6103 [410]. Le gène CDR3461 ne se trouve en revanche pas exclusivement chez les souches 027. Il a été également identifié chez d'autres souches virulentes de PR 001 et 078 ; il est par ailleurs divergent parmi les autres PR [315].

- **Les éléments mobiles**

La souche 027 R20291 contient, dans son génome, deux transposons conjugatifs qui sont des variants d'éléments conjugatifs trouvés chez la souche 630 [254]. Le premier a une structure comparable à celle de CTn1 de la souche 630 (*CTn1-like*). Le deuxième, Tn6103, est similaire à CTn5 de la souche 630 (avec 85 % d'identité de séquence). Dans la souche 027 R20291, ce dernier comprend cependant trois insertions différentes représentant probablement trois transposons mobilisables. Ces transposons ont été dénommés Tn6104, Tn6105 et Tn6106 (voir figure 36 et tableau V) [410].

Au sein du premier transposon *CTn1-like*, deux gènes codant une intégrase (CDR3475) et un régulateur transcriptionnel (CDR3476) sont respectivement sous et surexprimés chez le mutant Δ FliC par rapport à la souche sauvage 027. Trois autres gènes appartenant au transposon Tn6103 (CDR1740-41 et CDR1805) sont également différentiellement exprimés chez le mutant Δ FliC, ainsi que trois gènes (CDR1747 et CDR1759-60) appartenant au transposon Tn6104. Ces trois derniers gènes ont été identifiés comme des gènes uniques à la souche R20291 [254] : le gène CDR1747 coderait un régulateur transcriptionnel et les gènes CDR1759-60 coderaient les composés d'un système dit « toxine-antitoxine ».

Les systèmes toxine-antitoxine (TA) bactériens ont été découverts il y a une vingtaine d'années sur des plasmides à bas nombre de copie. Ils sont composés de deux gènes organisés en opéron, l'un codant une toxine stable et l'autre une antitoxine instable capable de neutraliser l'effet de la toxine. Les systèmes TA sont fortement représentés au sein de l'ensemble des génomes bactériens. Ils se localisent aussi bien sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons,...) que dans les chromosomes, ce qui suggère que le transfert horizontal de gènes participe à leur dissémination. Le principe de fonctionnement des systèmes TA plasmidiques repose sur la nature instable et rapidement dégradable de l'antitoxine permettant d'induire, sous l'effet de la toxine non inhibée, la mort des cellules n'ayant pas intégrée le plasmide en question. L'abondance de ces entités génétiques au niveau des chromosomes bactériens suggère néanmoins un ou plusieurs rôles biologiques au sein de la cellule. En plus de leur rôle dans la réponse au stress par mort cellulaire programmée ou par maintien d'un état de dormance, il a été en effet supposé que ces systèmes pourraient avoir un rôle dans le maintien et la stabilité d'autres

éléments génétiques mobiles. Ils pourraient également servir de protection contre certains éléments génétiques phagiques ou plasmidiques [411, 412]. Tout récemment, un système toxine-antitoxine, nommé MazEF-cd, a été identifié dans le génome de la souche 630 [413]. Toutefois, le système TA dérégulé par la mutation de *fliC* est différent de celui identifié chez la souche 630 puisqu'il apparaît comme étant unique à la souche R20291 [254].

Le génome de *C. difficile* comprend également des séquences répétées dérivant de séquences préexistantes dans le chromosome lui-même ou d'éléments génétiques transmissibles comme les bactériophages et les plasmides conjugatifs. Cette famille de séquences répétées, à laquelle on a attribué l'acronyme CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) se caractérise par sa capacité de transmission aux cellules filles. Quatre gènes *cas* sont associés aux séquences CRISPR et sont toujours situés à proximité des loci CRISPR, d'où le nom du complexe CRISPR-cas [414, 415, 416]. Le système CRISPR-cas agirait comme un mécanisme de défense contre les phages et les plasmides permettant aux bactéries d'intégrer des fragments de gènes étrangers au sein de leurs chromosomes qui leur confèrent une immunité et une résistance antivirale [417, 418, 419]. Un des loci CRISPR de *C. difficile* (CDR2994-98) est surexprimé chez le mutant Δ FliC. Ce locus est retrouvé chez les souches de PR 027 (CD196 et R20291) et non chez la souche 630. Mais, son rôle est tout à fait inconnu et il est donc difficile d'imaginer son lien avec la flagelline.

En plus de tous ces éléments mobiles différenciellement exprimés chez le mutant Δ FliC, trois autres gènes codant des protéines phagiques (CDR1817-18, CDR1080 et CDR1418) et un autre gène codant une résolvase du transposon Tn21 (CDR3281) sont également surexprimés chez le mutant. Le dernier gène étant absent du génome de la souche 630 [254]. Il a été démontré que les souches de PR 027 peuvent contenir plusieurs bactériophages morphologiquement et génétiquement variés [420]. Ces phages ne comportent a priori pas de gènes de virulence particuliers, mais deux d'entre eux ont été associés à une hyperproduction des toxines TcdA et TcdB avec une surexpression des gènes régulateurs *tcdC* et *tcdR* et du gène *tcdE* [421]. L'origine et le rôle des gènes des protéines phagiques différenciellement exprimés dans cette étude ne sont pas précisément connus, mais l'un de ces gènes (CDR1818) code une endolysine putative, une enzyme capable de dégrader le peptidoglycane [422].

- **Les gènes du transport membranaire**

Plusieurs gènes codant des transporteurs transmembranaires sont sous- ou surexprimés dans la mutant Δ FliC par rapport à la souche sauvage 027 R20291 (annexe III). La plupart de ces transporteurs sont des ABC transporteurs (*ATP Binding Cassette*) ou des systèmes PTS (*PhosphoTransferase Systems*).

Les systèmes de transport de type ABC, également appelés « *traffic ATPases* », constituent l'une des plus vastes familles de protéines retrouvées dans tout le règne vivant. Le terme ABC-transporteur regroupe un ensemble de systèmes de transport phylogénétiquement proches et remarquablement bien conservés dans leur organisation. Ils sont caractérisés par leur structure comprenant au moins quatre domaines : deux domaines hydrophobes formant un canal de translocation et deux domaines hydrophiles impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport (figure 37). Ces transporteurs peuvent importer ou exporter une variabilité considérable de substrats allant des ions aux macromolécules. De par la grande variété de molécules prises en charge, les systèmes ABC peuvent exercer de nombreuses fonctions physiologiques chez les eucaryotes et les procaryotes, les plaçant au cœur d'enjeux médicaux et économiques importants. Ils permettent notamment le transport de nutriments, la transduction de signaux, l'export de facteurs de virulence et sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques de nombreux agents pathogènes [423, 424]. Au sein de la famille des ABC-transporteurs, les systèmes d'import de peptides bactériens, couramment appelés Opp pour *Oligo-Peptide-Permeases*, sont fréquemment impliqués dans différents processus cellulaires. Outre leur rôle dans la nutrition et leur participation dans la croissance cellulaire, les systèmes Opp interviennent dans l'internalisation de peptides qui sont perçus par la cellule comme des signaux impliqués soit dans la perception de l'environnement soit dans des phénomènes de communication intercellulaire (conjugaison, sporulation, quorum sensing...) [423].

Au total, neuf gènes d'ABC transporteurs sont différenciellement exprimés chez le mutant Δ FliC. Un opéron en particulier, codant des protéines Opp (CDR0783-87), est très fortement sous-exprimé. Les résultats de la biopuce ainsi que ceux de la RT-PCR en temps réel montrent une expression 33 fois plus faible chez le mutant (Tableau IV). Cet opéron pourrait donc jouer un rôle dans la virulence de *C. difficile*. Trois autres gènes de transporteurs surexprimés chez le

mutant (CDR2981, CDR2983 et CDR0551) semblent aussi être importants puisqu'ils ont été identifiés comme spécifiques aux souches de PR 027 [254].

Les systèmes PTS, quant à eux, sont des systèmes enzymatiques complexes qui permettent le transport et la phosphorylation concomitante des sucres qui sont ensuite libérés sous forme phosphorylée dans la cellule. Ils sont constitués de 5 ou 6 protéines qui peuvent être regroupés en deux classes : les protéines générales du PTS qui sont l'enzyme I (EI) et l'HPr et les protéines spécifiques dites enzymes II (EII). Les enzymes EI et HPr permettent la phosphorylation des différents sucres entrant dans la cellule par l'intermédiaire de perméases spécifiques. Cela est rendu possible grâce au phosphoenolpyruvate (PEP), un intermédiaire de la glycolyse (figure 38, [425]). Les systèmes PTS ont été identifiés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et positif [426] incluant des bactéries pathogènes et des pathogènes opportunistes de l'homme et des animaux [427, 428]. Le transport de sucres rapidement métabolisables (tel que le glucose) via le PTS peut avoir une influence significative sur la physiologie cellulaire, la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'utilisation et le métabolisme d'autres sources de carbones et aussi sur le contrôle de l'activité de régulateurs transcriptionnels parmi lesquels, des régulateurs de gènes de virulence [429]. Il a été d'ailleurs démontré que chez *C. difficile*, le glucose ainsi que d'autres sucres rapidement métabolisables régulent négativement les gènes des toxines TcdA et TcdB [209]. De plus, le régulateur de la répression catabolique, CcpA, réprime l'expression des toxines TcdA et TcdB en présence de sources de carbone PTS rapidement métabolisables [234].

Dans le mutant Δ FliC, neuf gènes de transporteurs PTS sont différentiellement exprimés. Trois d'entre eux paraissent particulièrement intéressants à cause de leur forte expression. En effet, le gène du transporteur CDR2927-28 est 50 fois plus exprimé, celui du transporteur CDR3136 est 11 fois plus exprimé et le transporteur CDR2862-66 est, lui, 25 fois moins exprimé. L'expression de ces trois transporteurs a été vérifiée et validée par RT-PCR en temps réel. Cette technique étant un peu plus sensible que la technique des biopuces, le taux d'expression trouvé est plus élevé que celui constaté par la biopuce (tableau IV). Il a été également constaté que l'expression des gènes des toxines TcdA et TcdB est diminuée chez le mutant Δ FliC, cela pourrait être en liaison avec l'un ou plusieurs de ces systèmes PTS dérégulés suite à la mutation.

Un autre groupe de transporteurs, le groupe MFS (*Major Facilitator Superfamily*) également appelé *uniporter-symporter-antiporter family*, est aussi touché par la mutation de FliC (CDR2077, CDR2428, CDR0832, CDR3476-77 et CDR1356). Ces transporteurs sont en fait des transporteurs secondaires actifs qui catalysent le transport de petites molécules en utilisant des gradients des ions (H⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻) comme source d'énergie [430].

Un gène de transport de fer (CDR1367) est surexprimé chez le mutant Δ FliC. Le fer jouerait-il alors un rôle dans la pathogénicité accrue du mutant ? Ou tout simplement dans le cycle cellulaire de *C. difficile* ? En tout cas son rôle dans la virulence et dans le processus de colonisation d'autres pathogènes a été clairement démontré *in vivo* [431].

Tous ces systèmes de transport cités précédemment jouent, en général, un rôle crucial dans la défense de la bactérie contre les composants toxiques et dans son adaptation aux différents écosystèmes qu'elle colonise [432]. Cela suppose donc que ces systèmes pourraient intervenir dans la survie et l'adaptation de *C. difficile* à son environnement gastro-intestinal, et ce en association directe ou indirecte avec le processus de production des flagelles.

- **Autres gènes importants pour l'adaptation et la survie de *C. difficile* dans le tractus digestif**

Le mutant Δ FliC semble réussir à mieux métaboliser certaines sources de carbone non habituelles comme le tréhalose ou le L-rhamnose. Le gène codant la tréhalase (CDR2930) et les gènes codant les enzymes de biosynthèse du L-rhamnose (CDR0224-26) sont fortement surexprimés chez le mutant Δ FliC. L'analyse en RT-PCR en temps réel indique respectivement des taux d'expression de 177,63 et 12,66 fois supérieurs chez le mutant que chez la souche sauvage (tableau IV). Le rôle de ces enzymes a été décrit chez d'autres pathogènes. Il a été démontré que *E. coli* utilise le tréhalose comme source de carbone et d'énergie en cas de stress oxydatif [433, 434]. Chez *Vibrio cholera*, *Streptococcus mutans* et *Salmonella enterica*, le L-rhamnose a été également décrit comme une source d'énergie, mais aussi comme un élément de structure pour certains de leurs antigènes, ou comme médiateur de virulence [435, 436, 437].

Le mutant Δ FliC semble également capable de dégrader davantage la tyrosine, via la *p*-hydroxyphenylacetate decarboxylase (CDR0152-54, *hpdBCA*, 1,7 fois plus exprimé chez le

mutant) et ainsi former plus de *p*-cresol, un produit bactériostatique. Contrairement aux autres bactéries, *C. difficile* peut normalement tolérer de fortes concentrations en *p*-cresol ce qui lui permet d'avoir un avantage sur les autres espèces bactériennes et de mieux subsister dans le milieu environnant [292, 294]. Néanmoins, la surproduction de *p*-cresol par le mutant Δ FliC n'explique pas forcément la capacité du mutant à tuer des souris monoxéniques. Ceci dit la tyrosine peut être utilisée par la bactérie comme une source d'énergie. De manière globale, il semble tout à fait évident que la flagelline permet de moduler le processus de production du *p*-cresol.

- **Les gènes de la sporulation**

Plusieurs gènes impliqués dans la formation de la paroi et de l'exosporium, ainsi que dans les autres étapes du processus de sporulation sont surexprimés chez le mutant Δ FliC, suggérant l'existence d'un lien entre ce phénomène et celui de la production des flagelles.

Trois des sept gènes identifiés en tant que gènes de la paroi sporale sont surexprimés suite à l'inactivation du gène *fliC* (CDR1511, CDR2291 et CDR0522). Ces gènes codent respectivement les protéines CotA, CotD et CotCA (anciennement dénommé CotJB1) (figure 39). Deux autres gènes (CDR0212-13) codant des protéines putatives de la paroi sont également fortement surexprimés (annexe III).

Un autre gène CDR0920 (= CD1063A) annoté comme un gène codant une protéine hypothétique conservée a été récemment identifié au niveau d'une région de 27,8 kb du génome de *C. difficile* contenant plusieurs gènes de protéines sporales (figure 40). Même si son rôle est encore inconnu, il apparaît comme un gène important dans cette analyse puisque son expression est fortement touchée suite à la mutation de *fliC* (7.5 x plus exprimé chez le mutant Δ FliC). Dans la même région chromosomique, trois autres gènes (*bcd2*, *etfA2* et *thlA1*) sont aussi surexprimés chez le mutant Δ FliC. Ces gènes sont probablement impliqués dans la production du butyrate pour le métabolisme énergétique de la spore [292].

Trois gènes en relation avec la synthèse de l'exosporium sont assez fortement surexprimés chez le mutant Δ FliC. Il s'agit des gènes *bclA1* (CDR0337), *bclA2* (CDR3090) et

bclA3 (CDR3193). Au niveau de la souche 027 R20291, le gène *bclA1* serait non fonctionnel à cause d'une mutation par rapport au même gène dans la souche 630 qui est, lui, parfaitement fonctionnel [314].

Le gène CDR1476 (= CD1579) codant une histidine kinase capable de phosphoryler directement la protéine Spo0A est également surexprimée chez le mutant Δ FliC [253]. Cette étape de phosphorylation fait normalement suite à un signal environnemental et cellulaire indiquant des conditions défavorables pour la croissance végétative et permet par la suite l'activation de la protéine Spo0A qui a pour rôle de contrôler divers phénomènes post-exponentiels. Plusieurs pathogènes utilisent d'ailleurs Spo0A pour moduler leur virulence et leur capacité de survie [438, 439, 440]. Cela a été aussi démontré pour *C. difficile* chez qui l'inactivation de *spo0A* entraîne une diminution de l'expression du gène de la toxine TcdA ainsi qu'une baisse de sa production.

Afin de mesurer l'impact phénotypique de la dérégulation des gènes de sporulation, des tests de sporulation ont été réalisés à la fois *in vitro* et *in vivo* sur les deux souches 027 R20291 et Δ FliC. Ces tests ont montré une production plus élevée de spores chez la souche mutante Δ FliC aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (figure 41), confirmant ainsi le lien existant entre les deux phénomènes de sporulation et de mobilité. Ce lien entre la sporulation et la mobilité a déjà été évoqué chez *B. subtilis* chez qui les deux phénomènes sont inversement régulés. Cela semble aussi être le cas chez *C. difficile* [441, 442].

- **Les gènes des toxines**

Même si l'étude de cytotoxicité du mutant FliC de la souche 027 ne montre aucune différence avec celle de la souche sauvage, l'étude transcriptionnelle montre la modification de l'expression des gènes des deux toxines TcdA et TcdB ainsi que celle de la toxine binaire CDT.

Les gènes *tcdA*, *tcdB* et *tcdC* sont sous-exprimés chez le mutant Δ FliC (tableau IV). Bien que le gène *tcdC* de la souche 027 R20291 soit inactif à cause des délétions qui lui sont spécifiques, il a cependant été associé à l'augmentation de la virulence chez la souche R20291 [215, 216, 324].

Les gènes de la toxine binaire (CDT) sont en revanche surexprimés 2,5 fois plus chez le mutant Δ FliC. Ce rapport d'expression a été confirmé par RT-PCR en temps réel (tableau IV). La mort des souris infectées par le mutant Δ FliC pourrait donc être en partie expliquée par une surproduction de la toxine binaire. Cette explication n'est cependant qu'une hypothèse puisque jusque là le rôle de la toxine binaire dans la pathogenèse de *C. difficile* n'a pas été clairement établi. Elle a toutefois été associée, à plusieurs reprises, à des infections sévères et mortelles [274, 275, 279]. Malheureusement, nous n'avons pas pu quantifier la production de cette toxine chez le mutant et la souche sauvage faute de tests standardisés.

Ces résultats prouvent donc l'existence d'un lien entre la production des toxines et le phénomène de production des flagelles. Cela s'ajoute au rôle des flagelles dans la colonisation de *C. difficile* ainsi que dans d'autres processus cellulaires que nous avons développé tout au long de cette analyse. Il est par conséquent légitime de considérer la flagelline et les flagelles de manière générale comme de vrais facteurs de virulence chez *C. difficile*.

- **Les gènes de protéines hypothétiques potentiellement intéressantes**

Plusieurs gènes codant des protéines à fonctions inconnues sont également différentiellement exprimés chez le mutant Δ FliC. Ces gènes semblent aussi intéressants, surtout ceux qui sont fortement exprimés et ceux qui sont spécifiquement associés aux souches hypervirulentes 027 (tableau VI). Parmi les gènes dont l'expression est très différenciée entre les deux souches mutante et sauvage, figurent les gènes CDR0197, CDR1929, CDR3285 et CDR0920 qui sont respectivement 5,5, 7,5, 8,7 et 5,5 fois plus exprimé chez le mutant. Ces gènes pourraient faire l'objet d'études ultérieures pour essayer d'analyser leur éventuelle implication dans la virulence de *C. difficile*.

- **Expression différentielle de gènes spécifiques aux souches de PR 027 et à la souche R20291**

Par une analyse génomique comparative entre une souche épidémique 027 (R20291), une souche non épidémique 027 (CD196) et une souche 012 (CD630), il a été possible d'identifier des gènes spécifiques aux souches 027 (CDR20291 et CD196) et d'autres uniques à la souche

R20291, souche dans laquelle le mutant Δ FliC a été construit et avec laquelle nous avons réalisé ce travail [254].

Plusieurs de ces gènes ont été touchés par la mutation de *fliC* (tableaux VI et VII). Etant donné la nature spécifique de ces gènes, ils apparaissent donc comme des candidats très intéressants pour la compréhension et l'explication de la virulence observée chez le mutant Δ FliC de la souche 027. En effet, contrairement au même mutant Δ FliC construit dans la souche 630 Δ erm, celui-ci se comporte tout à fait différemment et il est le seul à induire la mort d'une grande majorité de souris. Cette différence de comportement pourrait donc être liée à l'expression de gènes variables entre les deux souches. Ainsi, il y aurait 42 gènes spécifiques aux souches 027 qui sont différemment exprimées dans la souche mutante Δ FliC. Parmi les produits de ces gènes, trois sont identifiés dans le sécrétome de la bactérie [391]: le composé CDTb de la toxine binaire (CDR2492), une hémagglutinine (CDR0440, 9 fois sous-exprimé chez le mutant) et une protéine putative d'hydrolyse/liaison au peptidoglycane (CDR2278, 3,6 fois surexprimé chez le mutant Δ FliC). Ces produits de sécrétion et plus particulièrement ceux qui sont surexprimés pourraient avoir un rôle plus ou moins important dans le caractère spécifique observé chez le mutant Δ FliC. Le gène de l'hémagglutinine qui est nettement sous-exprimé chez le mutant Δ FliC indique la possibilité de co-régulation entre les deux gènes *fliC* et CDR0440. Ce dernier pourrait être un gène de virulence potentiel comme cela a été décrit chez d'autres pathogènes et plus particulièrement chez *Clostridium botulinum*. Il a été en effet démontré que chez cette bactérie, l'hémagglutinine participe à sa protection contre le pH faible et les enzymes rencontrées dans le tube digestif. Elle est aussi capable de rompre les jonctions intercellulaires de l'épithélium intestinal et interviendrait donc par ce biais pour faciliter le passage de la toxine BoNT au travers de la barrière transépithéliale [443, 444, 445].

De plus, quatre gènes uniques à la souche 027 R20291 sont aussi surexprimés chez le mutant Δ FliC dont CDR1747 et CDR1759-60 qui codent respectivement un régulateur transcriptionnel et les modules d'un système de toxine-antitoxine cité précédemment. Ces gènes sont portés par le transposon conjugatif Tn6104 et peuvent donc intégrer le génome d'autres bactéries [410]. Le quatrième gène CDR1774 code une protéine non encore caractérisée ; mais vu la forte probabilité que cette protéine puisse jouer un rôle dans le processus de virulence du

mutant Δ FliC, il est alors intéressant de l'étudier de plus près et d'essayer de comprendre son rôle et son mode de fonctionnement.

II.2.3.2. Analyse transcriptomique *in vitro* du mutant Δ FliC complémenté

La multitude de gènes touchés par la mutation de *fliC* souligne l'importance de la flagelline et des flagelles dans les processus de survie et de virulence de la bactérie. Afin de valider ces résultats, nous avons décidé d'analyser la souche complémentée de *fliC*, toujours en essai de transcriptomique. Cet essai ne pouvant pas être réalisé en modèle animal à cause de la difficulté au maintien du plasmide *in vivo*, il a été choisi de réaliser l'analyse *in vitro* avec la souche complémentée d'une part et les souches sauvage et mutante Δ FliC ayant intégré le même plasmide sans insert (le gène *fliC*) d'autre part. La souche complémentée a été obtenue par intégration du plasmide pMTL84151 contenant le gène *fliC* dans le mutant Δ FliC. La complémentation a été vérifiée à l'échelle génique par PCR et à l'échelle phénotypique par évaluation de la capacité de mobilité en milieu BHI 0,4 % agar. La cinétique de croissance des trois souches Δ FliC, 027 et Δ FliC complémentée a été également comparée afin de vérifier l'absence d'écarts de croissance significatifs pouvant influencer sur les résultats de l'étude transcriptomique (figure 42).

L'analyse transcriptomique des ARNm des trois souches Δ FliC, 027 et Δ FliC complémentée montre le rétablissement total, dans la souche complémentée, de l'expression des gènes affectés suite à l'inactivation de *fliC*. Ces résultats nous permettent donc d'affirmer avec certitude que seule la mutation de *fliC* est à l'origine les variations d'expression retrouvées *in vivo*, suggérant ainsi l'implication directe ou indirecte de *fliC* dans plusieurs processus cellulaires dont la sporulation et la production de toxines.

En comparant les résultats de la transcriptomique *in vitro* des deux souches mutante Δ FliC et sauvage 027 R20291, nous avons constaté la variation de gènes tout à fait différents de ceux variants *in vivo*. Globalement, 258 gènes sont différentiellement exprimés dans la souche mutante Δ FliC cultivée *in vitro* contre 310 dans le modèle animal. Parmi ces gènes, 123 sont surexprimés et 135 sont sous-exprimés. Seuls 26 gènes sont communs aux deux analyses *in vivo* et *in vitro* et trois d'entre eux sont exprimés inversement. Dans l'analyse *in vitro*, nous ne

retrouvons pas la majorité des gènes qui ont été jugés intéressants lors de la précédente analyse, à part quelques gènes de régulation, de transport membranaire et de sporulation. Aucun gène de mobilité, y compris *fliD*, n'est à priori affecté par la mutation de *fliC in vitro*. Aucun gène de toxine n'est non plus affecté par cette mutation. *C. difficile* se comporte donc différemment en milieu de culture (PY) et en modèle animal, renforçant l'idée de l'importance des études réalisées sur des modèles animaux afin d'améliorer la compréhension de la physiopathologie des processus infectieux.

II.2.4. Conclusion

La flagelline FliC semble jouer un rôle important dans le processus d'adhésion et de colonisation de *C. difficile*. Ce rôle est plus ou moins variable selon les souches et il paraît plus remarquable chez la souche hypervirulente 027. Mais pour cette souche, le rôle de la flagelline ne semble pas se restreindre au phénomène d'adhésion et de colonisation, il impliquerait également plusieurs autres processus cellulaires. Cela a été constaté suite à l'inactivation du gène *fliC* dans la souche 027 R20291. Le mutant provoque en effet la mort de la majorité des souris infectées, phénomène rarement obtenu dans ce type de modèle animal. Les souris qui ont succombé à l'infection par le mutant ont montré des signes d'ICD avec diarrhée et inflammation du caecum. Cela n'a cependant pas été observé chez le même mutant Δ FliC construit dans la souche 630 Δ erm, ce qui montre la spécificité de ce caractère chez la souche 027. L'analyse transcriptomique globale comparant l'ensemble des ARNm de la souche sauvage à ceux de la souche mutante a permis de montrer la dérégulation de plusieurs gènes. Au total, 310 gènes ont été différentiellement exprimés chez le mutant Δ FliC dont 179 sont surexprimés et 131 sont sous-exprimés. La plupart de ces gènes sont en rapport avec la sporulation, la colonisation, la production de toxines, la résistance aux antibiotiques, la régulation, le transport membranaire, mais aussi en liaison avec des mécanismes d'adaptation et de survie de la bactérie dans le tractus gastro-intestinal.

La mutation de *fliC* s'accompagne donc d'un changement d'expression de certains facteurs de virulence avec d'un côté la diminution de l'expression de facteurs de colonisation et d'un autre côté l'augmentation de l'expression des gènes de la toxine binaire, des gènes de sporulation et

de gènes de réponse aux stress (production du p-cresol, système toxine-antitoxine, système padR, système crispr...). La rupture du flagelle semble s'accompagner d'une répression des gènes d'adhésines comme les gènes de la protéine de liaison à la fibronectine *fbpA*, de la protéine de choc thermique *groEL* ou encore de la protéine *cwp66*. Cela a pour effet la diminution de la capacité d'adhésion du mutant qui a été d'ailleurs observée lors des essais *in vivo*. En contre partie, la souche mutante Δ FliC serait capable de produire plus de spores tant *in vitro* qu'*in vivo* et elle serait également capable de produire plus de toxine binaire (vu l'augmentation de l'expression des gènes *cdtA* et *cdtB*). Il est en revanche important de signaler que les gènes des deux toxines TcdA et TcdB sont réprimés chez le mutant Δ FliC. L'ensemble de ces résultats montre ainsi l'existence d'un lien entre la flagelline ou les flagelles de manière générale et les phénomènes de production de toxines, de sporulation et de réponse aux conditions de stress. Les flagelles seraient un facteur de virulence incontestable chez *C. difficile*. Les résultats récapitulatifs permettant la comparaison des effets de mutation des flagelles pour les deux souches 630 Δ erm et 027 R20291 sont résumés dans le tableau VIII.

Plusieurs gènes spécifiques aux souches 027 (R20291 et CD196) et d'autres spécifiques à la souche R20291 seule sont également affectés par la mutation de *fliC*. Ces gènes pourraient expliquer la particularité du rôle de la flagelline dans la souche 027 par rapport à celle de la souche 630 Δ erm.

Parmi les produits des gènes spécifiques aux souches 027, trois sont retrouvés dans le sécrétome de la bactérie. Leur hyperproduction pourrait donc être directement liée à la mort des souris. Or deux de ces gènes sont surexprimés chez le mutant Δ FliC : CDR2278 qui code une protéine putative d'adhésion/hydrolyse du peptidoglycane et CDR2492 qui code la sous-unité CDTb de la toxine binaire. Ce résultat impliquant la sous-unité CDTb souligne encore une fois l'importance de la toxine binaire dans la virulence de *C. difficile* même si cela n'a pas été clairement établi jusqu'ici.

Les gènes uniques à la souche 027 R20291 sont également d'une importance capitale car ils peuvent être tout aussi importants voire plus importants que les gènes spécifiques aux souches 027. Quatre de ces gènes uniques sont affectés par l'inactivation de *fliC* et ils sont tous surexprimés. Trois d'entre eux appartiennent au transposon conjugatif Tn6104 (CDR1759-60 et CDR1747) et le quatrième code une protéine non encore caractérisée. Ces gènes présentent donc

une piste intéressante qui pourrait expliquer le caractère virulent de la souche mutante Δ FliC de *C. difficile* et dont l'exploration pourrait améliorer notre compréhension par rapport aux fonctions de la flagelline.

Au vu des données obtenues par ces expériences de transcriptomique, le rôle des flagelles et de la flagelline semble être assez complexe impliquant probablement différents régulateurs et différents facteurs de virulence, du moins chez la souche 027 R20291.

Cinétique de colonisation *in vivo* de *C. difficile* 027

III. Etude de la cinétique de colonisation *in vivo* de *C. difficile* 027 R20291 par analyse transcriptomique

III.1. Introduction

Afin de mieux comprendre le phénomène d'hypervirulence de la souche 027 de *C. difficile*, nous nous sommes proposés d'étudier son processus d'infection et de colonisation dans un modèle de souris monoxéniques. Pour cela, nous avons étudié la transcriptomique de la souche 027 R20291 à différents moments de la colonisation en ciblant des temps précoces d'infection, 4 h et 6 h, et des temps plus tardifs, 14 h et 38 h, en comparaison au temps intermédiaire 8 h. Une étude semblable a été réalisée dans notre laboratoire en étudiant la transcriptomique *in vivo* de la souche 630 aux temps 8 h, 14 h et 38 h [446]. Même si les deux études sont fondées sur l'utilisation de biopuces différentes, il est néanmoins possible de faire une comparaison globale entre les cinétiques de colonisation des deux souches. Ainsi, le choix des temps d'étude s'est fait sur la base de l'étude précédente afin de pouvoir effectuer une comparaison entre les processus de colonisation des souches 027 et 630. Nous avons de plus choisi deux temps plus précoces (4 h et 6 h post-infection) afin de pouvoir révéler l'expression de gènes d'adhésion et de colonisation. Le choix d'un temps encore plus précoce était toutefois impossible en raison de la faible concentration bactérienne impliquant l'obtention d'une trop faible quantité d'ARN pour l'analyse transcriptomique. La révélation de l'expression de gènes impliqués de près ou de loin à la virulence de la bactérie au cours du processus d'infection *in vivo* contribuera d'une part à élucider les mécanismes de colonisation de la bactérie et éventuellement dévoiler des produits/fonctions bactériens qui pourront constituer des candidats vaccinaux voire des cibles potentielles de molécules antibiotiques, et d'autre part à mieux comprendre le phénomène d'hypervirulence de la souche 027 et ainsi à améliorer la lutte contre l'infection à *C. difficile*.

III.2. Matériels et méthodes

Le protocole expérimental repose sur une analyse transcriptomique globale à partir des ARN extraits et purifiés des cellules bactériennes de la souche de *C. difficile* R20291 colonisant les caeca de souris monoxéniques, et ce à différents temps du processus de colonisation (4, 6, 8,

14 et 38 h post-infection, figure 43). Au total, trente souris ont été inoculées par voie orale à raison de 10^8 bactéries /souris. A chaque temps d'étude, six souris ont été sacrifiées et leurs caeca prélevés et immédiatement mis en solution de stabilisation pour les ARN. Les caeca ont été ensuite grattés et lavés afin de récupérer un maximum de bactéries luminales et adhérentes. Les cellules bactériennes ainsi obtenues ont été centrifugées et conservées à -80°C jusqu'au moment de l'extraction de l'ARN. A chaque temps de prélèvement, le nombre de bactéries et de spores a été déterminé sur deux souris différentes. L'ARN a été par la suite extrait au moyen du kit FastRNA Pro Blue (QBiogene) et puis l'ARN bactérien a été séparé de l'ARN eucaryote par le kit MICROBEnrich (Ambion). L'ARN purifié et traité à la DNase a été analysé au bioanalyseur et dosé au spectrophotomètre. L'absence de contamination en ADNg a été également vérifiée par RT-PCR en temps réel. Les ARN de qualité optimale ont été sélectionnés pour le reste de l'analyse. Ils ont été transcrits en ADNc et marqués aux fluorophores Cy3 et Cy5 et puis hybridés sur les biopuces (Agilent™) contre de l'ADN génomique de la souche 027. Au terme d'une hybridation de 17 heures, les biopuces ont été lavées et scannées. Le résultat d'expression des gènes généré a été statistiquement analysé et traité grâce à l'interface MA2HTML (M. Monot, Institut Pasteur). L'identification des gènes variables et la détermination de groupes de gènes d'intérêts nous a ainsi permis d'étudier les particularités de la souche 027 au cours de l'infection. L'expression de 14 gènes différentiellement exprimés aux différents temps d'analyse a été vérifiée par RT-PCR en temps réel (tableau IX, annexe IV). L'étude par RT-PCR en temps réel a été réalisée à partir d'ADNc de 6 réplicats biologiques et les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression de trois gènes de référence (*polIII*, *gyrA* et *rpoA*).

La figure 44 résume les différentes étapes de la démarche expérimentale. Le détail des protocoles est expliqué dans la section « Matériels et méthodes » du chapitre précédent (II.2.2).

III.3. Résultats et discussion

L'analyse transcriptomique globale montre une expression différentielle pour 707 gènes durant les différentes étapes de la colonisation. Parmi ces gènes, 126 sont différentiellement exprimés pendant les temps précoces (4-6 h) et 216 présentent une variation d'expression aux temps plus tardifs (14-38 h) (figure 45). Tous les facteurs

d'expression sont obtenus par comparaison du taux d'expression au temps t par rapport au temps 8 h. Les facteurs d'expression retenus sont ceux qui sont supérieurs à 2.

III.3.1. Gènes du métabolisme et de transport membranaire

Plusieurs gènes en relation avec le métabolisme du carbone et des acides aminés sont exprimés au cours du processus d'infection intestinale de la souche 027. Cela indique donc l'hyperactivité métabolique et énergétique de la souche. De plus, de nombreux transporteurs sont également sollicités dont des ABC transporteurs et beaucoup de systèmes PTS. D'autres transporteurs impliqués dans l'import/export d'ions de fer, de calcium et de sodium sont aussi différentiellement exprimés au cours de l'infection. Un de ces transporteurs est particulièrement surexprimé à 4, 6, 14 et 38 h ; il s'agit d'un système PTS permettant le transport du galactitol, un produit dérivé du galactose (CDR2214-16). Aucune étude particulière n'a cependant été réalisée sur ce type de produit. Il serait alors intéressant d'explorer cet aspect du métabolisme bactérien qui pourrait être spécifique et important chez *C. difficile*.

III.3.2. Expression *in vivo* des gènes régulateurs

Une quinzaine de gènes régulateurs sont également exprimés à différents temps de l'infection. Il s'agit pour la plupart de régulateurs transcriptionnels, mais il y a également un système à deux composants fortement exprimé à 8 h (CDR2525-26) dont le rôle est inconnu.

Le gène codant une protéine modulatrice du facteur sigma 54 (CDR2336) est aussi exprimé 5 x plus à 8 h d'infection. Cette protéine agirait sur le facteur sigma 54 qui a pour rôle d'amorcer la transcription de l'ARN en présence de l'ARN polymérase. Le facteur sigma 54 a été associé à l'expression de gènes intervenant dans la fixation de l'azote, l'utilisation du nitrate, le transport du CO₂, la dégradation du xylène ou encore la synthèse des flagelles et des fimbriae [447, 448]. Son rôle chez *C. difficile* n'a pas encore été étudié mais il semble en tout cas jouer un rôle au cours du processus d'infection.

Le facteur sigma CsFT (codé par le gène CDR0598) interviendrait également au cours du processus d'infection puisque son expression est augmentée à 14 h et à 38 h par rapport aux

temps précédents. Ce facteur sigma fait partie de la famille ECF (*ExtraCytoplasmic Function*) dont le rôle est de contrôler la réponse à des signaux environnementaux spécifiques.

Un autre gène régulateur agissant par quorum sensing (*agr2*, CDR3187) est exprimé tout au long des temps 6, 8, 14 et 38 h. Bien que ce gène ait été décrit comme spécifique aux souches 027 (R20291 et CD196) [254], celui-ci a été identifié dans d'autres souches de *C. difficile* (80 % des souches analysées) [315]. L'analyse de son expression par RT-PCR en temps réel montre une expression significative à 8, 14 et 38 h d'infection, suggérant le rôle de ce régulateur dans le processus de colonisation intestinale par la bactérie (tableau IX).

III.3.3. Expression *in vivo* des gènes des facteurs de virulence

III.3.3.1. Gènes de protéines de surface et de protéines flagellaires

D'après les résultats des biopuces, aucun gène d'adhésine connu n'est différentiellement exprimé au cours des premières étapes de colonisation intestinale, du moins à partir de 4 h d'infection. Cependant l'évaluation par RT-PCR en temps réel de l'expression de trois gènes d'adhésines (*fbpA*, *cwp84* et *cwp66*) montre des résultats différents (tableau IX, figure 46). Le gène *fbpA* serait exprimé de façon similaire à 4, 6, 8 et 14 h, puis son expression baisse de presque un facteur 2 à 38 h, ce qui suppose une plus forte expression aux premières heures d'infection. Le gène *cwp66* est surexprimé pendant les temps 6, 8 et 14 h et le gène *cwp84* est exprimé deux fois plus à 14 h. Ceci montre donc l'implication de ces protéines dans le processus de colonisation intestinale par la souche 027 R20291. Chez la souche 630, l'expression relative de ces trois gènes (*fbpA*, *cwp66* et *cwp84*) est quasi constante à 8, 14 et 38 h [449], ce qui suggère l'établissement d'un processus de colonisation plutôt différent entre les deux souches. Plusieurs autres gènes de protéines de surface et de paroi semblent aussi être impliqués dans le système de colonisation de la souche 027 R20291. Parmi les protéines codées par ces gènes, il y aurait Cwp10 et Cwp25 deux paralogues de *SlpA* qui seraient respectivement surexprimées à partir de 38 h et de 8 h post-infection.

Cette différence de colonisation entre les deux souches a été également observée *in vitro* sur des cellules épithéliales humaines Caco-2 (figure 47), ainsi qu'au cours de la cinétique de colonisation de souris monoxéniques (figure 48). En comparaison à la souche 630 Δ erm, la

souche 027 R20291 est en effet capable de mieux adhérer aux cellules épithéliales *in vitro* et est également capable de mieux coloniser les fèces et les caeca de souris. Le suivi de la cinétique de colonisation *in vivo* montre que la souche 027 R20291 commence à coloniser le tractus gastro-intestinal assez rapidement tout comme la souche 630 Δ erm, puis le taux de colonisation reste constant à partir de 24 à 48 h d'infection. Ce taux de colonisation est toutefois plus important pour la souche 027 que pour la souche 630 Δ erm (différence de $4,48 \times 10^8$ bactéries/g de fèces) (figure 48). Cette différence n'a pas été cependant observée en essai de compétition entre les deux souches (figure 49).

Concernant les gènes flagellaires, très peu de gènes sont régulés pendant les temps d'analyse : les gènes *flbD*, *motB* et *fliP* sont régulés positivement en début du processus d'infection (à 4 h) alors que les gènes *flhA*, *flhG* et *fliN* le sont plus tardivement (à 38 h). Ni l'expression du gène *fliD* ni celle du gène *fliC* ne semblent varier au cours de ces temps d'étude.

III.3.3.2. Gènes des toxines

L'expression des gènes de toxines semble être assez précoce chez la souche R20291. A 6 h d'infection, on constate déjà une augmentation de l'expression des gènes des toxines TcdA et TcdB par rapport au taux d'expression à 4 h. Cela est également valable pour le gène *tcdE*. Le taux d'expression continue à augmenter jusqu'à un taux 3 à 4 fois plus supérieur à 38 h d'infection (figure 50). Les résultats de la transcriptomique de la souche 630 montrent par ailleurs une forte expression des gènes des toxines TcdA et TcdB ainsi que du régulateur positif TcdR à partir de 38 h d'infection [446]. Cela indique que les gènes de toxines sont exprimés plus tôt chez la souche 027 R20291 en comparaison à la souche 630.

Les gènes de la toxine binaire *cdtA* et *cdtB* sont également exprimés assez tôt chez la souche R20291 avec un maximum d'expression à 8 h et à 14 h. Ce taux d'expression est toutefois nettement plus inférieur à celui des gènes des toxines TcdA et TcdB (figure 50).

Jusqu'à ce jour, toutes les études réalisées sur les souches 027 se contredisent quant à la capacité de ces souches à produire plus de toxines par rapport aux autres souches moins virulentes. Alors que certains chercheurs confirment que les souches 027 sont capables de produire une plus grande quantité de toxines, d'autres montrent le contraire. Au terme de cette

étude, nous confirmons que la souche 027 R20291 présente une transcription rapide des gènes de toxines TcdA et TcdB suggérant une production de toxines précoce au cours du processus d'infection. Cette production précoce induirait alors une apparition rapide des symptômes de l'infection. De plus, les souches 027 sont capables de produire la toxine binaire qui semble aussi être produite assez rapidement. Cette toxine pourrait ainsi avoir un rôle important dans le processus de virulence des souches 027. Même si son rôle dans la pathogénicité divise encore la communauté scientifique, notre étude actuelle ainsi que la précédente (avec le mutant Δ FliC) suggèrent fortement son implication dans la virulence de *C. difficile*.

III.3.3.3. Gènes de la sporulation

De très nombreux gènes de sporulation sont fortement exprimés au cours de la cinétique de colonisation intestinale par la souche 027 R20291. Le processus de sporulation se déroule normalement en sept étapes depuis la forme végétative jusqu'à l'obtention de la spore mature (figure 51) [450]. *In vivo* au cours de nos expériences, les gènes impliqués dans les différentes étapes de formation de la spore sont exprimés à différents temps du processus d'infection de la souche 027. Une certaine logique temporelle se dégage d'ailleurs à partir des temps d'expression de ces gènes (figure 52). La reconstitution de leur cinétique d'expression permet de constater un début d'expression des gènes de sporulation 6 h après l'infection (correspondant au début d'expression de *spo0A*). Le processus de sporulation se poursuit jusqu'à 38 h après l'infection avec une forte expression des gènes des protéines de la paroi sporale à 14 h et 38 h (jusqu'à 75 fois plus qu'aux temps précédents).

Parallèlement, nous avons observé l'expression de quelques gènes de germination 8 h après l'infection. Cela correspond probablement au processus de germination des spores présentes dans l'inoculum de départ (88 spores/ml).

Le phénomène de sporulation de la souche 027 R20291 intervient donc assez rapidement au cours de l'infection de l'hôte. Ce résultat a été confirmé par la détermination de la cinétique de production de spores récoltées dans les fèces de souris. Cette cinétique montre l'obtention des premières spores à partir de 8 h d'infection ($\approx 10^4$ spores / g fèces). Le taux de sporulation continue ensuite d'augmenter jusqu'à un niveau constant de $10^6 - 10^7$ spores/ml à partir de 24 h

(figure 53.a). La détermination du nombre de spores pouvant adhérer aux caeca de souris après 7 jours d'infection par la souche 027 R20291 montre un taux d'adhésion de 8×10^4 spores / g caeca contre un taux de 1.5×10^5 bacilles / g caeca (figure 53. b). Ceci prouve donc que les spores peuvent adhérer aux cellules épithéliales tout autant que les bacilles. Grâce à cet essai et celui du mutant Δ FliC, nous avons montré, pour la première fois, la capacité des spores de *C. difficile* à adhérer aux cellules épithéliales *in vivo*. Jusque là, une seule équipe s'est penchée sur cette problématique et avait montré la capacité des spores de *C. difficile* à adhérer aux cellules en culture Caco-2 [451].

III.3.4. Expression *in vivo* de gènes spécifiques aux souches 027 et à la souche R20291

Un des aspects intéressants de cette étude est la révélation de gènes spécifiques aux souches 027 s'exprimant en cours de l'infection intestinale. D'après la liste de gènes proposée par Stabler et coll., 9 gènes spécifiques aux souches R20291 et CD196 et 4 gènes présents uniquement chez la souche R20291 sont exprimés au cours du processus d'infection (tableaux X et XI) [254]. Ces gènes sont très importants puisqu'ils peuvent, entre autres, être à l'origine de l'hypervirulence de la souche 027 R20291. Une étude approfondie de ces gènes pourrait donc apporter plus de précision par rapport à leur rôle et leur éventuelle implication dans le processus de virulence de *C. difficile*. De plus, trois de ces gènes (CDR0043-45) ont été identifiés en tant que marqueurs génétiques d'hypervirulence par Knetsch et coll. [317]. Ces derniers ont en effet montré que ces gènes sont des inserts spécifiques à la souche 027 R20291 ainsi qu'à d'autres souches phylogénétiquement liées à celle-ci. Les ORF CDR0043, CDR0044 et CDR0045, exclusivement exprimés à 4 h, codent respectivement une thymidylate synthétase (ThyA), une dihydrofolate réductase et une déacetylase. L'analyse du gène *thyA* par RT-PCR en temps réel montre cependant une variation non significative (tableau IX). Le rôle spécifique des produits de ces gènes uniques à la souche 027 dans le processus de virulence de cette souche reste à étudier.

III.4. Conclusion

L'analyse transcriptomique globale de la souche 027 R20291 au cours des étapes initiales du processus d'infection *in vivo* nous a permis de révéler certaines particularités spécifiques à cette souche. En plus de sa capacité à mieux coloniser les cellules intestinales murines, la souche 027 R20291 serait capable de produire les toxines TcdA, TcdB et la toxine binaire très rapidement au cours du processus d'infection. Elle serait également capable de sporuler assez précocement (l'expression de gènes de sporulation débute à 6 h et l'apparition des premières spores détectables dans les fèces de souris est observée à 8 h post-infection).

Beaucoup de gènes de transport membranaire, de régulation et d'éléments mobiles sont également exprimés à différents temps de l'infection, ce qui suggère le rôle potentiel des produits de ces gènes dans les premières étapes de la colonisation intestinale par *C. difficile*. Cela concerne aussi des gènes du métabolisme des sucres, des acides aminés et des acides nucléiques.

Neuf gènes spécifiques aux souches 027 et quatre autres spécifiques à la souche 027 R20291 sont également exprimés, le plus souvent à 4 h post-infection. L'hyper-expression de ces gènes pourrait expliquer le caractère spécial et « hypervirulent » de la souche R20291. Toutefois, le ou les fonctions de ces gènes ne sont pas encore connues à ce jour. Ces gènes constituent donc des pistes intéressantes pouvant amener à comprendre l'hypervirulence et l'adaptabilité *in vivo* de cette souche.

La variation de l'expression d'un nombre important de gènes codant des protéines hypothétiques au cours de l'infection est aussi d'intérêt. Même si la nature et la fonction de ces gènes ne sont pas encore connues, ils pourraient cependant jouer un rôle dans le processus d'infection surtout ceux qui sont fortement exprimés. Au total, 87 gènes codant des protéines hypothétiques sont exprimés à un moment de la cinétique d'infection. Sept de ces gènes sont potentiellement intéressants : CDR0921-22 et CDR0924-26 (respectivement en amont et en aval du gène *ccpA*) sont 30 à 100 fois plus exprimés à 8, 14 et 38 h, CDR3482 est 30 à 37 fois plus exprimé à 14 et 38 h et CDR1478 est 110 à 156 fois plus exprimé à 14 h et à 38 h après l'infection. Ces gènes et leurs produits constituent également des pistes potentielles dont l'étude permettra une meilleure compréhension du phénomène de virulence accrue de la souche 027 de *C. difficile*.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'adhésion aux cellules épithéliales intestinale et la colonisation du tube digestif par *C. difficile* sont considérés comme des pré-requis pour l'infection de l'hôte. Ces étapes font intervenir plusieurs facteurs de colonisation, adhésines et enzymes protéolytiques.

La protéine de liaison à la fibronectine, FbpA, est considérée comme une adhésine potentielle dont l'inhibition par des anticorps spécifiques limite l'adhésion de *C. difficile* aux cellules épithéliales en culture. Jusqu'alors, l'impossibilité d'inactiver les gènes de *C. difficile* était un obstacle à la détermination du rôle exacte des adhésines dans la virulence bactérienne. Le développement récent d'une nouvelle technique permettant l'inactivation stable des gènes chez *C. difficile* a permis de s'affranchir de ce problème. Cette technique, nommée ClosTron a permis de construire un mutant d'inactivation du gène *fbpA* dans la souche 630 Δ erm. L'analyse de la capacité d'adhésion et de colonisation du mutant Δ FbpA *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles de souris gnotoxéniques a permis de montrer l'implication de FbpA dans le processus de colonisation de *C. difficile* 630 Δ erm. Le rôle de FbpA apparaît cependant minime, probablement à cause de l'implication d'autres protéines de surface dans l'adhésion et la colonisation. Le phénomène de colonisation est en effet un phénomène multifactoriel faisant intervenir plusieurs adhésines. Une différence de colonisation en essai de compétition *in vivo* entre la souche parentale 630 Δ erm et la souche mutante Δ FbpA indique cependant un rôle conséquent de cette protéine qui agirait en synergie avec d'autres adhésines.

Au vu de ces résultats, la protéine FbpA pourrait être un bon candidat vaccinal. Son utilisation serait en revanche plus efficace en association avec d'autres protéines de surface. Des essais d'immunisation avec des protéines de liaison à la fibronectine ont été entrepris pour d'autres pathogènes comme *S. aureus* et *S. pyogenes* avec des résultats encourageants [452-458].

En revanche, il a été impossible de construire un mutant Δ FbpA dans la souche épidémique 027 R20291 malgré les nombreuses tentatives d'inactivation. L'obtention d'un mutant Δ FbpA dans cette souche aurait pu permettre de déceler d'éventuelles particularités liées à cette protéine. D'autres équipes ont été également confrontées à des échecs lors de la construction de mutants par la technique du ClosTron. Cette technique a donc ses limites et ne semble pas être toujours efficace. Récemment, d'autres moyens génétiques d'inactivation génique ont été utilisés avec

succès chez *C. difficile* [248, 267]. Ces techniques pourraient donc être testées pour la construction du mutant Δ FbpA dans la souche 027.

Les flagelles semblent également jouer un rôle dans la colonisation intestinale par *C. difficile*. Tasteyre et coll. ont montré que les flagelles, la flagelline FliC et la protéine de coiffe FliD sont capables d'adhérer *in vitro* au mucus caecal de souris axéniques. De plus, des souches flagellées sont capables de mieux adhérer à la muqueuse caecale *in vivo* que des souches non flagellées. Ces données suggèrent l'implication des flagelles dans l'adhésion intestinale de *C. difficile*. Afin d'élucider le rôle exact des flagelles, différents mutants flagellaires ont été construits dans la souche non épidémique 630 Δ erm et dans la souche épidémique 027 R20291 puis caractérisés *in vitro* et *in vivo*. Quatre protéines flagellaires ont été ciblées : la protéine du filament FliC, la protéine de coiffe FliD, la protéine du crochet FlgE et la protéine constitutive du moteur de mobilité MotB.

Des différences majeures ont été observées entre les deux souches. La souche 027 R20291 est mono-flagellée alors que la souche 630 Δ erm présente des flagelles péritriches à sa surface. Les mutants Δ FliC, Δ FliD Δ FlgE et Δ MotB de la souche 027 R20291 adhèrent moins aux cellules épithéliales en culture que la souche sauvage, alors que les mutants de la souche 630 Δ erm adhèrent plus aux cellules en culture.

L'étude *in vivo* du mutant Δ FliC de la souche 630 Δ erm, seul ou en compétition avec la souche sauvage, montre la même cinétique d'implantation que celle de la souche sauvage. Une faible capacité d'adhésion aux caeca est constatée pour le mutant Δ FliC en essai de compétition. Ces résultats suggèrent que les flagelles de la souche 630 Δ erm auraient un rôle moins important en tant qu'adhésines.

Chez la souche 027 R20291, le mutant Δ MotB (flagellé et non mobile) s'implante et adhère aux cellules caecales au même taux que la souche sauvage. En revanche, le mutant Δ FliC (non flagellé et non mobile) présente des difficultés à coloniser les souris en compétition (souche parentale ou Δ MotB). Cela suggère que le processus de colonisation de la souche 027 fait intervenir les flagelles en tant qu'adhésines et que la mobilité est accessoire. Cette capacité des

flagelles à adhérer aux cellules épithéliales de façon indépendante du processus de mobilité a déjà été observée chez d'autres espèces bactériennes comme *E. coli* [172].

La comparaison de la cinétique de colonisation des deux souches 630 Δ erm et 027 R20291 montre un léger avantage de la souche 027 en terme d'implantation et d'adhésion aux caeca. Cet avantage pourrait être expliqué par la particularité d'adhésion des flagelles.

Le mutant Δ FliC de la souche 027 R20291 présente néanmoins une autre particularité. Testé seul en modèle de souris monoxéniques, il provoque la mort de la quasi-totalité des souris infectées. Cela suggère que le rôle des flagelles ne soit pas limité au pouvoir d'adhésion de la souche. Une étude transcriptomique permettant l'analyse de l'expression globale des gènes a été effectuée sur ce mutant afin de mieux comprendre le ou les rôles des flagelles de la souche 027, ainsi que les raisons expliquant une telle virulence. L'analyse montre la surexpression des gènes de la toxine binaire et la sous-expression des gènes des deux toxines TcdA et TcdB chez le mutant. Si la surexpression du gène de la toxine binaire est corrélée à une surproduction de cette toxine, il est envisageable qu'elle soit responsable de la mort des souris. A ce jour, le rôle de la toxine binaire n'est cependant pas clairement défini et son rôle dans la sévérité des infections est controversé [274, 275, 279]. La construction d'un double mutant pour les deux gènes de la toxine binaire et sa caractérisation *in vivo* permettrait de préciser le rôle de cette toxine dans la virulence de la souche R20291. Malheureusement, nous ne disposons pas de moyens techniques permettant le dosage de la toxine binaire afin de vérifier la corrélation entre la surexpression du gène et la surproduction de la toxine. Nous avons toutefois prévu de quantifier la production des toxines TcdA et TcdB chez le mutant Δ FliC de la souche 027 *in vivo*.

Chez le mutant Δ FliC de la souche 630 Δ erm, le gène *tcdA* est plutôt surexprimé. Une étude récente montre qu'à côté de *tcdA*, les gènes *tcdB*, *tcdR* et *tcdE* sont également surexprimés chez un mutant Δ FliC de la souche 630 Δ erm et que les deux toxines TcdA et TcdB sont produites à un taux plus important [459]. La surexpression de TcdA observée au cours de notre étude serait ainsi corrélée à une surproduction de cette toxine. Cette surproduction pourrait expliquer la plus forte virulence observée chez le mutant Δ FliC par rapport à la souche parentale 630 Δ erm dans le modèle hamster. De plus, dans cette souche, les gènes de la toxine binaire ne sont pas différenciellement exprimés par rapport à la souche sauvage. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les gènes *cdtA* et *cdtB* chez 630 Δ erm ne sont pas fonctionnels [254, 272].

La variation de l'expression des gènes des différentes toxines chez les mutants Δ FliC suggère l'existence d'un système de régulation commun régissant la production des flagelles et des toxines. Son mécanisme d'action apparemment complexe, reste cependant à déterminer.

Tout comme chez les bactéries à gram positif, un système hiérarchique de synthèse des flagelles existe chez *C. difficile*. Les gènes du locus F3 codant des protéines précoces de la synthèse des flagelles (ex. *fliA*, *fliG*, *flgE*, *motA*, *motB*) réguleraient les gènes du locus F1 codant les protéines tardives des flagelles (ex. *fliC*, *fliD*, *flgM*) [459]. L'étude chez la souche 630 Δ erm d'Aubry et coll., montre que des mutants des gènes du locus F3 (dont FliC) induisent une surproduction de TcdA et TcdB, alors que des mutants des gènes du locus F1 ont l'effet inverse. Ainsi, l'expression des toxines TcdA et TcdB serait contrôlée par un système de régulation à deux niveaux faisant intervenir différents loci flagellaires [459]. Dans notre étude, nous avons montré que le mutant Δ FlgE présente une activité cytotoxique moindre par rapport à la souche sauvage 630 Δ erm contrairement aux deux mutants Δ FliC et Δ FliD. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Aubry et coll. Concernant la souche 027 R20291, la sous-expression des gènes *tcdA* et *tcdB* suggère un mécanisme de régulation de la production des toxines différent de celui de la souche 630 Δ erm. D'ailleurs, une différence à l'échelle génétique entre les loci F1 des deux souches a été décrite [254]. Cette différence génétique pourrait être à l'origine des différences phénotypiques observées au cours de nos travaux. Au vu de ces observations, il serait intéressant de tester *in vivo* les autres mutants flagellaires dont nous disposons. Cette étude pourrait aussi être complétée par une étude des mécanismes impliqués dans la régulation des flagelles et des autres facteurs de virulence, en ciblant par exemple les régulateurs *flgM* (facteur anti-sigma régulant négativement la synthèse de la flagelline FliC) ou *fliA* (facteur sigma 28). L'analyse transcriptomique des mutants des deux régulateurs pourrait apporter des éléments de réponse. Les résultats de ces études pourront contribuer à une meilleure compréhension du mécanisme de co-régulation des flagelles et des toxines chez la souche hypervirulente 027 R20291.

L'analyse transcriptomique du mutant Δ FliC de la souche 027 R20291 montre également la surexpression de plusieurs gènes de sporulation, laquelle est corrélée à une production plus importante de spores. Cela pourrait suggérer que la flagelline est aussi impliquée dans le processus de sporulation. La surexpression du gène d'une histidine kinase capable de

phosphoryler la protéine Spo0A est particulièrement intéressante puisque Spo0A est un régulateur transcriptionnel important intervenant dans les premières étapes de sporulation. Chez *C. difficile*, l'analyse d'un mutant Δ Spo0A a d'ailleurs montré l'implication de Spo0A dans la régulation positive de la production des toxines ainsi que dans la persistance et le pouvoir de transmission de la bactérie [253, 460].

L'ensemble de ces résultats montre que les phénomènes de formation des flagelles, de production de toxines et de la sporulation seraient régulés de manière interdépendante chez la souche 027. Cette régulation impliquerait aussi celle de certaines adhésines dont les gènes apparaissent réprimés (*fbpA*, *cwp66*, *cwp84* et *groEL*) chez le mutant Δ FliC. Ce type de relation entre gènes de flagelles et gènes de virulence a été décrit chez d'autres pathogènes. Chez *Vibrio cholerae*, par exemple, le système de régulation des flagelles induit notamment l'expression d'une adhésine facilitant la colonisation intestinale de la bactérie, mais il réprime également l'expression d'autres facteurs de virulence (toxine cholérique, hémolysine, gènes du système de sécrétion de type VI...) [461-464]. Chez *Campylobacter jejuni*, les flagelles seraient plutôt co-régulés avec certains facteurs de virulence [180, 465].

La variation de l'expression génique observée chez le mutant Δ FliC de la souche 027 R20291 *in vivo* peut rendre compte de la variation de la réponse de l'hôte en l'absence de flagelles. Les flagelles de *C. difficile* sont spécifiquement reconnus par le récepteur de la réponse innée TLR5, et l'interaction FliC-TLR5 active les voies de signalisation des MAPK et de NF- κ B responsables de la transcription des gènes codant des cytokines pro-inflammatoires [466, 467]. Cette réponse particulière de l'hôte serait absente chez les souris infectées par le mutant Δ FliC. L'environnement de l'hôte créé en réponse aux autres produits bactériens induirait alors une réponse bactérienne différente de celle observée chez la souche sauvage. L'expression différentielle de ces gènes chez le mutant Δ FliC traduit donc sa réponse aux nouvelles conditions environnementales au sein de l'hôte. Cette dynamique pourrait expliquer l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'adaptation à l'environnement (gènes de synthèse du tréhalose et du L-rhamnose, de dégradation de la tyrosine, etc.), la signalisation cellulaire, la régulation et le transport membranaire, révélée dans l'analyse du mutant Δ FliC. D'ailleurs, la différence des résultats entre les gènes exprimés chez la souris et ceux exprimés *in vitro* est probablement due aux interactions hôte-pathogène spécifiques au modèle *in vivo*.

Le grand nombre de gènes différentiellement exprimés chez le mutant Δ FliC de la souche 027 R20291 (8.7 % de la totalité des gènes) suggère le rôle important de la flagelline et son implication dans plusieurs processus cellulaires. De manière surprenante, certains gènes inattendus comme des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes codant des éléments mobiles sont également différentiellement exprimés chez le mutant. Aucun lien ne paraît évident entre ces gènes et la flagelline, mais ils pourraient avoir un rôle dans la virulence de la bactérie.

Afin d'obtenir une vue d'ensemble sur l'adaptation de la bactérie à l'hôte et afin de mieux comprendre le comportement de la souche épidémique 027 au cours du développement de l'infection *in vivo*, une analyse cinétique du transcriptome de cette souche hypervirulante a été réalisée dans un modèle de souris monoxéniques. Cette étude a révélé l'expression de nombreux groupes de gènes dont certains sont uniques à la souche R20291. Parmi les gènes d'adhésines caractérisés à ce jour, trois gènes, *fbpA*, *cwp66* et *cwp84*, montrent une variation d'expression aux premiers temps d'infection (jusqu'à 14 h après infection). Cette variation subtile n'a été perçue que par analyse en RT-PCR en temps réel et non par l'analyse en biopuce. Cela confirme néanmoins que ces adhésines interviennent lors de la colonisation du tractus digestif de l'hôte. Deux autres gènes paralogues de *slpA*, *cwp10* et *cwp25*, sont également surexprimés, ce qui suggère leur implication dans le processus de colonisation. Le gène *cwp10* est surexprimé à 38 h, suggérant que la protéine Cwp10 est probablement impliquée dans la colonisation prolongée de l'intestin par la bactérie. L'étude des deux protéines de surface Cwp10 et Cwp25 chez la souche 027 R20291 paraît tout à fait intéressante étant donné leur nette expression au cours du processus de colonisation. La caractérisation de ces protéines pourra être effectuée par l'étude de la capacité d'adhésion des protéines recombinantes de Cwp10 et Cwp25 ou par l'étude *in vitro* et/ou *in vivo* de mutants d'inactivation des gènes correspondants.

Le rôle de la flagelline dans l'adhésion, nous laissait attendre une surexpression du gène au cours de la cinétique de colonisation. Cependant, l'expression d'aucun gène du locus F3 n'était modifiée. Seuls quelques gènes du locus F1 (*flbD*, *motB*, *fliP*...) montrent une surexpression plutôt faible. On pourrait imaginer que la flagelline soit exprimée tôt et rapidement au cours du processus d'infection pour permettre à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Une expression rapide de *fliC* permettrait aussi à la bactérie de détecter des signaux particuliers

et de favoriser par la suite la modulation de l'expression de facteurs de colonisation et de virulence, comme cela a été démontré précédemment.

L'analyse du transcriptome de la souche 027 R20291 montre également l'expression successive des gènes de sporulation. La sporulation semble commencer dès 6 h après l'infection et continuer jusqu'à 38 h. La rapidité d'expression de ces gènes, ainsi que leur fort taux d'expression confirme l'importance de la sporulation dans le processus infectieux. Nous avons également réussi à montrer pour la première fois, que les spores de *C. difficile* sont capables d'adhérer aux cellules caecales *in vivo*. Cette propriété d'adhésion renforcerait la capacité de la bactérie à persister dans le tractus digestif et à induire des rechutes ultérieures.

Par ailleurs, l'analyse montre une cinétique d'expression croissante pour les gènes des deux toxines TcdA et TcdB. Leur expression intervient très tôt au cours du processus d'infection et augmente nettement à 14 h puis 38 h. Les gènes de la toxine binaire sont aussi exprimés aux différents temps d'analyse. En comparaison à la souche 630, la souche 027 R20291 semble produire, en plus de la toxine binaire, des taux plus importants de toxines TcdA et TcdB puisque l'expression de leurs gènes est plus précoce.

Dans cette étude, nous avons également identifiés quatre gènes spécifiques à la souche 027 R20291 (**CDR1781**, **CDR1784**, **CDR1786** et **CDR1788**) largement exprimés au cours du processus d'infection. Ces gènes peuvent être des facteurs de virulence putatifs et contribuer à la pathogénicité de la souche étudiée. Ils présentent donc des pistes intéressantes à étudier, notamment, au moyen de mutants d'inactivation.

CONCLUSION

Ces dernières années, l'incidence et la gravité des infections à *C. difficile* ont significativement augmenté en Amérique et en Europe. Cette évolution semble liée à l'émergence puis à la dissémination très rapide d'un clone particulièrement virulent de PR 027. Compte tenu de cette diffusion inquiétante, il est devenu indispensable de comprendre les raisons d'une telle virulence et de contrôler la dissémination de cette souche. Afin de répondre à la première question, nous nous sommes intéressés au processus de colonisation de la souche 027 R20291, souche responsable d'épidémie à Stoke Mandeville en Angleterre, le processus de colonisation étant une première étape indispensable à l'établissement de l'infection.

A l'aide de mutants d'inactivation, nous avons pu montrer l'implication de la protéine de liaison à la fibronectine FbpA et celle des flagelles dans le processus de colonisation de *C. difficile*. La flagelline semble jouer en plus un rôle dans la régulation de facteurs de virulence et l'adaptation de la bactérie à l'hôte. Ce rôle est toutefois différent entre la souche épidémique 027 R20291 et la souche non épidémique 630 Δ erm. Chez la souche R20291, la flagelline semble être au cœur d'un système de régulation important faisant intervenir des gènes d'adhésines, les gènes de toxines, les gènes de sporulation et des gènes de stress. Chez la souche 630 Δ erm, les flagelles seraient aussi impliqués dans la régulation des toxines, mais il s'agirait plutôt d'une régulation dans le sens inverse entre les gènes flagellaires et les gènes de toxines. La flagelline de 630 Δ erm semble en plus intervenir de manière moins importante dans l'adhésion et la colonisation.

L'analyse de la cinétique de colonisation de la souche 027 *in vivo* montre une capacité d'adhésion et de colonisation plus forte chez cette souche par rapport à la souche 630 Δ erm. Au cours de la colonisation, la souche 027 présente, de plus, une expression plus rapide des gènes de toxines et des gènes de sporulation, phénomènes pouvant contribuer au pouvoir pathogène accru de cette souche. Cette analyse a également permis de révéler l'expression de protéines de surface (Cwp10 et Cwp25) non exprimées au cours du processus infectieux de la souche 630 Δ erm, ainsi que l'expression de gènes spécifiques à la souche 027 R20291 (CDR1781, CDR1784, CDR1786 et CDR1788) qui pourraient être essentiels au processus de pathogénicité.

Le processus de colonisation est une étape indispensable mais complexe dans le processus infectieux de *C. difficile*. Ce processus fait intervenir plusieurs facteurs bactériens qui agissent en tant que amorceurs de l'infection mais qui peuvent également agir comme médiateurs de virulence. Au terme de cette étude, nous avons mis en évidence des différences majeures entre la

souche épidémique 027 R20291 et la souche non épidémique 630Δerm de *C. difficile*. La souche 027 R20291 aurait des systèmes de colonisation et de régulation différents qui pourraient lui conférer un avantage sélectif au sein du tractus gastro-intestinal de l'hôte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Hall ICaEOT. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935;49:390-402.
- [2] Bartlett JG, Moon N, Chang TW, Taylor N, Onderdonk AB. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 1978 Nov;75(5):778-82.
- [3] Blanckaert K, Coignard B, Grandbastien B, Astagneau P, Barbut F. [Update on *Clostridium difficile* infections]. *Rev Med Interne* 2008 Mar;29(3):209-14.
- [4] Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002 Jan 31;346(5):334-9.
- [5] Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 1994 Jan 27;330(4):257-62.
- [6] Deneve C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int J Antimicrob Agents* 2009 Mar;33 Suppl 1:S24-8.
- [7] Bartlett JG. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis* 1994 May;18 Suppl 4:S265-72.
- [8] Barbut vLJ-CPF. Epidémiologie et prévention des infections digestives à *Clostridium difficile*. *Revue française des laboratoires* 2004;368.
- [9] Vaishnavi C. Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indian J Med Res* 2010 Apr;131:487-99.
- [10] Sinh P, Barrett TA, Yun L. *Clostridium difficile* Infection and Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Gastroenterol Res Pract* 2011;2011:136064.
- [11] Karas JA, Enoch DA, Aliyu SH. A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. *J Infect* 2010 Jul;61(1):1-8.
- [12] Maroo S, Lamont JT. Recurrent *Clostridium difficile*. *Gastroenterology* 2006 Apr;130(4):1311-6.
- [13] Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 2000 Jun;38(6):2386-8.
- [14] Jacobs A, Barnard K, Fishel R, Gradon JD. Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections. Presentation of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2001 Mar;80(2):88-101.
- [15] Ben Abdelghani K, Gerard-Dran D, Morel J, Combe B. [*Clostridium difficile* associated reactive arthritis]. *Rev Med Interne* 2010 Mar;31(3):e13-5.
- [16] Birnbaum J, Bartlett JG, Gelber AC. *Clostridium difficile*: an under-recognized cause of reactive arthritis? *Clin Rheumatol* 2008 Feb;27(2):253-5.
- [17] Libby DB, Bearman G. Bacteremia due to *Clostridium difficile*--review of the literature. *Int J Infect Dis* 2009 Sep;13(5):e305-9.
- [18] Elliott B, Chang BJ, Golledge CL, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Intern Med J* 2007 Aug;37(8):561-8.
- [19] Gerding DN. Clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem. *Clin Infect Dis* 2004 Mar 1;38(5):646-8.
- [20] Aseeri M, Schroeder T, Kramer J, Zackula R. Gastric acid suppression by proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *Am J Gastroenterol* 2008 Sep;103(9):2308-13.
- [21] Yearsley KA, Gilby LJ, Ramadas AV, Kubiak EM, Fone DL, Allison MC. Proton pump inhibitor therapy is a risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Aug 15;24(4):613-9.
- [22] Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N. Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Hosp Infect* 2003 Jul;54(3):243-5.
- [23] Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA* 2005 Dec 21;294(23):2989-95.

- [24] De Andres S, Ferreira D, Ibanez M, Ballesteros A, Garcia B, Agud JL. Clostridium difficile colitis associated with valaciclovir. *Pharm World Sci* 2004 Feb;26(1):8-9.
- [25] Hookman P, Barkin JS. Clostridium difficile associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol* 2009 Apr 7;15(13):1554-80.
- [26] Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, Otterson MF, Lundeen S, et al. Impact of Clostridium difficile on inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007 Mar;5(3):345-51.
- [27] Kurd MF, Pulido L, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Clostridium difficile infection after total joint arthroplasty: who is at risk? *J Arthroplasty* 2008 Sep;23(6):839-42.
- [28] Munoz P, Giannella M, Alcala L, Sarmiento E, Fernandez Yanez J, Palomo J, et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in heart transplant recipients: is hypogammaglobulinemia the answer? *J Heart Lung Transplant* 2007 Sep;26(9):907-14.
- [29] Kawecki D, Chmura A, Pacholczyk M, Lagiewska B, Adadynski L, Wasiake D, et al. Detection of Clostridium difficile in stool samples from patients in the early period after liver transplantation. *Transplant Proc* 2007 Nov;39(9):2812-5.
- [30] Emoto M, Kawarabayashi T, Hachisuga MD, Eguchi F, Shirakawa K. Clostridium difficile colitis associated with cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 1996 Jun;61(3):369-72.
- [31] Resnik E, Lefevre CA. Fulminant Clostridium difficile colitis associated with paclitaxel and carboplatin chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 1999 Nov;9(6):512-4.
- [32] Chang VT, Nelson K. The role of physical proximity in nosocomial diarrhea. *Clin Infect Dis* 2000 Sep;31(3):717-22.
- [33] Eckert C, Barbut F. [Clostridium-difficile-associated infections]. *Med Sci (Paris)* 2010 Feb;26(2):153-8.
- [34] Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis* 2008 Jan 15;46 Suppl 1:S12-8.
- [35] Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, Borek AP, Hargrove JT, Carroll KC. Effective detection of toxigenic Clostridium difficile by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *J Clin Microbiol* 2006 Mar;44(3):1145-9.
- [36] Barbut F, Braun M, Burghoffer B, Lalande V, Eckert C. Rapid detection of toxigenic strains of Clostridium difficile in diarrheal stools by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2009 Apr;47(4):1276-7.
- [37] Bartlett JG. The case for vancomycin as the preferred drug for treatment of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis* 2008 May 15;46(10):1489-92.
- [38] Nelson R. Antibiotic treatment for Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2007(3):CD004610.
- [39] Herpers BL, Vlaminckx B, Burkhardt O, Blom H, Biemond-Moeniralam HS, Hornef M, et al. Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis* 2009 Jun 15;48(12):1732-5.
- [40] Lu CL, Liu CY, Liao CH, Huang YT, Wang HP, Hsueh PR. Severe and refractory Clostridium difficile infection successfully treated with tigecycline and metronidazole. *Int J Antimicrob Agents* 2010 Mar;35(3):311-2.
- [41] Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection. *N Engl J Med* 2011 Feb 3;364(5):422-31.
- [42] Bouillaut L, Sims C., Gomez A., Sears P., Seddon J., Sonenshein A.L., Babakhani F. Fidaxomicin inhibits production of toxin A and toxin B in Clostridium difficile. Poster in 7th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia - ClostPath, Iowa-USA. 2011

- [43] Gomez A. BL, Sonenshein A.L., Sears P., Nguyen L. and Babakhani F. Fidaxomicin inhibits spore production in *Clostridium difficile*. Poster in 7th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia - ClostPath, Iowa-USA. 2011.
- [44] McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2002 Jul;97(7):1769-75.
- [45] Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008 Jan 15;46 Suppl 1:S4-11.
- [46] Johnson S, Schriever C, Galang M, Kelly CP, Gerding DN. Interruption of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. *Clin Infect Dis* 2007 Mar 15;44(6):846-8.
- [47] McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, et al. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 1994 Jun 22-29;271(24):1913-8.
- [48] Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, et al. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis* 2000 Oct;31(4):1012-7.
- [49] Pillai A, Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008(1):CD004611.
- [50] Rohlke F, Surawicz CM, Stollman N. Fecal flora reconstitution for recurrent *Clostridium difficile* infection: results and methodology. *J Clin Gastroenterol* 2010 Sep;44(8):567-70.
- [51] Yoon SS, Brandt LJ. Treatment of refractory/recurrent *C. difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. *J Clin Gastroenterol* 2010 Sep;44(8):562-6.
- [52] Abougergi MS, Kwon JH. Intravenous immunoglobulin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a review. *Dig Dis Sci* 2011 Jan;56(1):19-26.
- [53] McPherson S, Rees CJ, Ellis R, Soo S, Panter SJ. Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. *Dis Colon Rectum* 2006 May;49(5):640-5.
- [54] Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, et al. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 2010 Jan 21;362(3):197-205.
- [55] Aboudola S, Kotloff KL, Kyne L, Warny M, Kelly EC, Sougioultzis S, et al. *Clostridium difficile* vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. *Infect Immun* 2003 Mar;71(3):1608-10.
- [56] Kotloff KL, Wasserman SS, Losonsky GA, Thomas W, Jr., Nichols R, Edelman R, et al. Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. *Infect Immun* 2001 Feb;69(2):988-95.
- [57] Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D, Keates S, Maroo S, Pothoulakis C, et al. *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 2005 Mar;128(3):764-70.
- [58] Ghose C, Kalsy A, Sheikh A, Rollenhagen J, John M, Young J, et al. Transcutaneous immunization with *Clostridium difficile* toxoid A induces systemic and mucosal immune responses and toxin A-neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun* 2007 Jun;75(6):2826-32.
- [59] Greenberg RN, Marbury TC, Foglia G, Warny M. Phase I dose finding studies of an adjuvanted *Clostridium difficile* toxoid vaccine. *Vaccine* 2012 Mar 16;30(13):2245-9.
- [60] Taylor CP, Tummala S, Molrine D, Davidson L, Farrell RJ, Lembo A, et al. Open-label, dose escalation phase I study in healthy volunteers to evaluate the safety and pharmacokinetics of a human monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A. *Vaccine* 2008 Jun 25;26(27-28):3404-9.
- [61] Leav BA, Blair B, Leney M, Knauber M, Reilly C, Lowy I, et al. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). *Vaccine* 2010 Jan 22;28(4):965-9.

- [62] Siddiqui F, O'Connor JR, Nagaro K, Cheknis A, Sambol SP, Vedantam G, et al. Vaccination with parenteral toxoid B protects hamsters against lethal challenge with toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* but does not prevent colonization. *J Infect Dis* 2012 Jan;205(1):128-33.
- [63] Pechine S, Janoir C, Collignon A. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. *J Clin Microbiol* 2005 Oct;43(10):5018-25.
- [64] Pechine S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc MC, Delmee M, et al. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2005 Feb;54(Pt 2):193-6.
- [65] Pechine S, Janoir C, Boureau H, Gleizes A, Tsapis N, Hoys S, et al. Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. *Vaccine* 2007 May 16;25(20):3946-54.
- [66] Pechine S, Deneve C, Le Monnier A, Hoys S, Janoir C, Collignon A. Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011 Oct;63(1):73-81.
- [67] Sandolo C, Pechine S, Le Monnier A, Hoys S, Janoir C, Coviello T, et al. Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*. *Eur J Pharm Biopharm* 2011 Nov;79(3):566-73.
- [68] Wright A, Drudy D, Kyne L, Brown K, Fairweather NF. Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):750-6.
- [69] Ni Eidhin DB, O'Brien JB, McCabe MS, Athie-Morales V, Kelleher DP. Active immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using surface-layer protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008 Mar;52(2):207-18.
- [70] O'Brien JB, McCabe MS, Athie-Morales V, McDonald GS, Ni Eidhin DB, Kelleher DP. Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins. *FEMS Microbiol Lett* 2005 May 15;246(2):199-205.
- [71] Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 2008 Nov 1;47(9):1162-70.
- [72] Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Senechal H, Cormier M, Vincent P. *Clostridium difficile* O27 colitis: Hospital-onset but community-acquired. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012 Feb 8.
- [73] Weese JS. *Clostridium difficile* in food--innocent bystander or serious threat? *Clin Microbiol Infect* 2010 Jan;16(1):3-10.
- [74] O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology* 2009 May;136(6):1913-24.
- [75] Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP. The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. *Int J Med Microbiol* 2010 Aug;300(6):387-95.
- [76] Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 2005 Sep;5(9):549-57.
- [77] Musher DM, Aslam S, Logan N, Nallacheru S, Bhaila I, Borchert F, et al. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis* 2005 Jun 1;40(11):1586-90.
- [78] Pepin J, Alary ME, Valiquette L, Raiche E, Ruel J, Fulop K, et al. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 2005 Jun 1;40(11):1591-7.
- [79] Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004 Aug 31;171(5):466-72.
- [80] Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2002 Feb 1;34(3):346-53.

- [81] O'Brien JA, Lahue BJ, Caro JJ, Davidson DM. The emerging infectious challenge of clostridium difficile-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007 Nov;28(11):1219-27.
- [82] Dubberke ER, Reske KA, Olsen MA, McDonald LC, Fraser VJ. Short- and long-term attributable costs of Clostridium difficile-associated disease in nonsurgical inpatients. *Clin Infect Dis* 2008 Feb 15;46(4):497-504.
- [83] Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ* 2005 Oct 25;173(9):1037-42.
- [84] Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 2005 Sep 24-30;366(9491):1079-84.
- [85] Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005 Dec 8;353(23):2442-9.
- [86] Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006 Oct;12 Suppl 6:2-18.
- [87] CDC. Surveillance for community-associated Clostridium difficile--Connecticut, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008 Apr 4;57(13):340-3.
- [88] Hirschhorn LR, Trnka Y, Onderdonk A, Lee ML, Platt R. Epidemiology of community-acquired Clostridium difficile-associated diarrhea. *J Infect Dis* 1994 Jan;169(1):127-33.
- [89] Noren T, Akerlund T, Back E, Sjoberg L, Persson I, Alriksson I, et al. Molecular epidemiology of hospital-associated and community-acquired Clostridium difficile infection in a Swedish county. *J Clin Microbiol* 2004 Aug;42(8):3635-43.
- [90] Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN. A case-control study of community-associated Clostridium difficile infection. *J Antimicrob Chemother* 2008 Aug;62(2):388-96.
- [91] Kuntz JL, Yang M, Cavanaugh J, Saftlas AF, Polgreen PM. Trends in Clostridium difficile infection among peripartum women. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010 May;31(5):532-4.
- [92] Venugopal AA, Gerding DN, Johnson S. Clostridium difficile infection rates and spectrum of disease among peripartum women at one hospital from 2003 to 2007 with molecular typing analysis of recovered Clostridium difficile isolates. *Am J Infect Control* 2011 Apr;39(3):206-11.
- [93] Unger JA, Whimbey E, Gravett MG, Eschenbach DA. The emergence of Clostridium difficile infection among peripartum women: a case-control study of a C. difficile outbreak on an obstetrical service. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011;2011:267249.
- [94] Rousseau C. Clostridium difficile chez le jeune enfant : dynamique de la colonisation et microbiote intestinal. Thèse en microbiologie à la faculté de pharmacie, Université Paris-Sud 11, 2011.
- [95] Zilberberg MD, Tillotson GS, McDonald C. Clostridium difficile infections among hospitalized children, United States, 1997-2006. *Emerg Infect Dis* 2010 Apr;16(4):604-9.
- [96] Toltzis P, Kim J, Dul M, Zoltanski J, Smathers S, Zaoutis T. Presence of the epidemic North American Pulsed Field type 1 Clostridium difficile strain in hospitalized children. *J Pediatr* 2009 Apr;154(4):607-8.
- [97] Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009 Jul;7(7):526-36.
- [98] Hammitt MC, Bueschel DM, Keel MK, Glock RD, Cuneo P, DeYoung DW, et al. A possible role for Clostridium difficile in the etiology of calf enteritis. *Vet Microbiol* 2008 Mar 18;127(3-4):343-52.
- [99] Songer JG, Anderson MA. Clostridium difficile: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 2006 Feb;12(1):1-4.

- [100] Avbersek J, Janezic S, Pate M, Rupnik M, Zidaric V, Logar K, et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe* 2009 Dec;15(6):252-5.
- [101] Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol* 2007 Jun;45(6):1963-4.
- [102] Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, Peregrine AS, Trotz-Williams LA, Arroyo LG, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006 Nov;12(11):1730-6.
- [103] Broda DM, DeLacy KM, Bell RG, Braggins TJ, Cook RL. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *Int J Food Microbiol* 1996 Apr;29(2-3):335-52.
- [104] Weese JS, Rousseau J, Arroyo L. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *Can Vet J* 2005 Jun;46(6):513-6.
- [105] Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007 Mar;13(3):485-7.
- [106] Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* 2009 May;15(5):819-21.
- [107] Metcalf D, Reid-Smith RJ, Avery BP, Weese JS. Prevalence of *Clostridium difficile* in retail pork. *Can Vet J* 2010 Aug;51(8):873-6.
- [108] Weese JS, Avery BP, Rousseau J, Reid-Smith RJ. Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Appl Environ Microbiol* 2009 Aug;75(15):5009-11.
- [109] Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Lett Appl Microbiol* 2010 Apr;50(4):362-5.
- [110] Harvey RB, Norman KN, Andrews K, Hume ME, Scanlan CM, Callaway TR, et al. *Clostridium difficile* in poultry and poultry meat. *Foodborne Pathog Dis* 2011 Dec;8(12):1321-3.
- [111] Metcalf D, Avery BP, Janecko N, Matic N, Reid-Smith R, Weese JS. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe* 2011 Apr;17(2):85-6.
- [112] Bouttier S, Barc MC, Felix B, Lambert S, Collignon A, Barbut F. *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerg Infect Dis* 2010 Apr;16(4):733-5.
- [113] al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol* 1996 Aug;45(2):133-7.
- [114] Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. *Emerg Infect Dis* 2009 May;15(5):817-8.
- [115] Cerquetti M, Molinari A, Sebastianelli A, Diociaiuti M, Petruzzelli R, Capo C, et al. Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates. *Microb Pathog* 2000 Jun;28(6):363-72.
- [116] Fagan RP, Albesa-Jove D, Qazi O, Svergun DI, Brown KA, Fairweather NF. Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol* 2009 Mar;71(5):1308-22.
- [117] Kirby JM, Ahern H, Roberts AK, Kumar V, Freeman Z, Acharya KR, et al. Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. *J Biol Chem* 2009 Dec 11;284(50):34666-73.
- [118] Calabi E, Ward S, Wren B, Paxton T, Panico M, Morris H, et al. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol* 2001 Jun;40(5):1187-99.
- [119] Dang TH, de la Riva L, Fagan RP, Storck EM, Heal WP, Janoir C, et al. Chemical probes of surface layer biogenesis in *Clostridium difficile*. *ACS Chem Biol* 2010 Mar 19;5(3):279-85.
- [120] Calabi E, Fairweather N. Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 2002 Jul;184(14):3886-97.

- [121] Karjalainen T, Waligora-Dupriet AJ, Cerquetti M, Spigaglia P, Maggioni A, Mauri P, et al. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 2001 May;69(5):3442-6.
- [122] Savariau-Lacomme MP, Lebarbier C, Karjalainen T, Collignon A, Janoir C. Transcription and analysis of polymorphism in a cluster of genes encoding surface-associated proteins of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 2003 Aug;185(15):4461-70.
- [123] Calabi E, Calabi F, Phillips AD, Fairweather NF. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* 2002 Oct;70(10):5770-8.
- [124] Ausiello CM, Cerquetti M, Fedele G, Spensieri F, Palazzo R, Nasso M, et al. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes Infect* 2006 Sep;8(11):2640-6.
- [125] Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, et al. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004 Jul 1;41(3):237-42.
- [126] Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun* 2001 Apr;69(4):2144-53.
- [127] Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A, Collignon A, Barc M, Bourlioux P, et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* 2001 Jan;147(Pt 1):87-96.
- [128] Emerson JE, Reynolds CB, Fagan RP, Shaw HA, Goulding D, Fairweather NF. A novel genetic switch controls phase variable expression of CwpV, a *Clostridium difficile* cell wall protein. *Mol Microbiol* 2009 Nov;74(3):541-56.
- [129] Reynolds CB, Emerson JE, de la Riva L, Fagan RP, Fairweather NF. The *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV is antigenically variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function. *PLoS Pathog* 2011 Apr;7(4):e1002024.
- [130] Fagan RP, Fairweather NF. *Clostridium difficile* has two parallel and essential Sec secretion systems. *J Biol Chem* 2011 Aug 5;286(31):27483-93.
- [131] Dembek M, Reynolds CB, Fairweather NF. *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV undergoes enzyme-independent intramolecular autoproteolysis. *J Biol Chem* 2012 Jan 6;287(2):1538-44.
- [132] Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, et al. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet* 2006 Jul;38(7):779-86.
- [133] Janoir C, Pechine S, Grosdidier C, Collignon A. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol* 2007 Oct;189(20):7174-80.
- [134] Hennequin C, Janoir C, Barc MC, Collignon A, Karjalainen T. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* 2003 Oct;149(Pt 10):2779-87.
- [135] Lin YP, Kuo CJ, Koleci X, McDonough SP, Chang YF. Manganese binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and is essential for fibronectin binding. *J Biol Chem* 2011 Feb 4;286(5):3957-69.
- [136] Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* 2005 Sep;24(6):389-99.
- [137] Courtney HS, Dale JB, Hasty DI. Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEP-2 tissue culture cells. *Infect Immun* 1996 Jul;64(7):2415-9.
- [138] Talay SR, Valentin-Weigand P, Jerlstrom PG, Timmis KN, Chhatwal GS. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* 1992 Sep;60(9):3837-44.

- [139] Okada N, Pentland AP, Falk P, Caparon MG. M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissue. *J Clin Invest* 1994 Sep;94(3):965-77.
- [140] Hanski E, Horwitz PA, Caparon MG. Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 1992 Dec;60(12):5119-25.
- [141] Caparon MG, Stephens DS, Olsen A, Scott JR. Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect Immun* 1991 May;59(5):1811-7.
- [142] Cue D, Dombek PE, Lam H, Cleary PP. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* 1998 Oct;66(10):4593-601.
- [143] Dombek PE, Cue D, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski S, Finlay BB, et al. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol* 1999 Feb;31(3):859-70.
- [144] Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Murakami J, Nakagawa I, Hamada S. Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the fba gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol Microbiol* 2001 Oct;42(1):75-86.
- [145] Molinari G, Talay SR, Valentin-Weigand P, Rohde M, Chhatwal GS. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* 1997 Apr;65(4):1357-63.
- [146] Terao Y, Kawabata S, Nakata M, Nakagawa I, Hamada S. Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. *J Biol Chem* 2002 Dec 6;277(49):47428-35.
- [147] Courtney HS, Hasty DL, Li Y, Chiang HC, Thacker JL, Dale JB. Serum opacity factor is a major fibronectin-binding protein and a virulence determinant of M type 2 *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 1999 Apr;32(1):89-98.
- [148] Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. *Mol Microbiol* 1995 Sep;17(6):1143-52.
- [149] Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Lerch PG, Morgenthaler JJ, Proctor RA, et al. Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect Dis* 1993 Mar;167(3):633-41.
- [150] Vaudaux PE, Francois P, Proctor RA, McDevitt D, Foster TJ, Albrecht RM, et al. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect Immun* 1995 Feb;63(2):585-90.
- [151] Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 1999 Dec;145 (Pt 12):3477-86.
- [152] Heilmann C, Niemann S, Sinha B, Herrmann M, Kehrel BE, Peters G. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J Infect Dis* 2004 Jul 15;190(2):321-9.
- [153] Piroth L, Que YA, Widmer E, Panchaud A, Piu S, Entenza JM, et al. The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis. *Infect Immun* 2008 Aug;76(8):3824-31.
- [154] Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett* 1999 Nov 1;180(1):103-9.
- [155] Mempel M, Schnopp C, Hojka M, Fesq H, Weidinger S, Schaller M, et al. Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-

- independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br J Dermatol* 2002 Jun;146(6):943-51.
- [156] Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 1999 Sep;67(9):4673-8.
- [157] Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol* 1999 Sep;1(2):101-17.
- [158] Jett BD, Gilmore MS. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect Immun* 2002 Aug;70(8):4697-700.
- [159] Christie J, McNab R, Jenkinson HF. Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 2002 Jun;148(Pt 6):1615-25.
- [160] McNab R, Holmes AR, Clarke JM, Tannock GW, Jenkinson HF. Cell surface polypeptide CshA mediates binding of *Streptococcus gordonii* to other oral bacteria and to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 1996 Oct;64(10):4204-10.
- [161] Dramsi S, Bourdichon F, Cabanes D, Lecuit M, Fsihi H, Cossart P. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* 2004 Jul;53(2):639-49.
- [162] Pracht D, Elm C, Gerber J, Bergmann S, Rohde M, Seiler M, et al. PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* 2005 May;73(5):2680-9.
- [163] Holmes AR, McNab R, Millsap KW, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley JL, et al. The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 2001 Sep;41(6):1395-408.
- [164] Janoir C, Grenery J, Savariau-Lacomme MP, Collignon A. [Characterization of an extracellular protease from *Clostridium difficile*]. *Pathol Biol (Paris)* 2004 Oct;52(8):444-9.
- [165] de la Riva L, Willing SE, Tate EW, Fairweather NF. Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 2011 Jul;193(13):3276-85.
- [166] ChapetonMontes D, Candela T, Collignon A, Janoir C. Localization of the *Clostridium difficile* cysteine protease Cwp84 and insights into its maturation process. *J Bacteriol* 2011 Oct;193(19):5314-21.
- [167] Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hebraud M. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett* 2006 Mar;256(1):1-15.
- [168] Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic Microbiol* 2012 Feb 23.
- [169] Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 1996 Jul;64(7):2445-8.
- [170] Ottemann KM, Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* 2002 Apr;70(4):1984-90.
- [171] Rabaan AA, Gryllos I, Tomas JM, Shaw JG. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun* 2001 Jul;69(7):4257-67.
- [172] Giron JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* 2002 Apr;44(2):361-79.
- [173] Liu SL, Ezaki T, Miura H, Matsui K, Yabuuchi E. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect Immun* 1988 Aug;56(8):1967-73.
- [174] Marchetti M, Sirard JC, Sansonetti P, Pringault E, Kerneis S. Interaction of pathogenic bacteria with rabbit appendix M cells: bacterial motility is a key feature in vivo. *Microbes Infect* 2004 May;6(6):521-8.

- [175] Sadziene A, Thomas DD, Bundoc VG, Holt SC, Barbour AG. A flagella-less mutant of *Borrelia burgdorferi*. Structural, molecular, and in vitro functional characterization. *J Clin Invest* 1991 Jul;88(1):82-92.
- [176] Young GM, Badger JL, Miller VL. Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 2000 Jul;68(7):4323-6.
- [177] Drake D, Montie TC. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1988 Jan;134(1):43-52.
- [178] Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 Apr;282(4):L751-6.
- [179] Richardson K. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect Immun* 1991 Aug;59(8):2727-36.
- [180] Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* 2007 Oct;15(10):456-61.
- [181] Young GM, Schmiel DH, Miller VL. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 May 25;96(11):6456-61.
- [182] Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Beecher DJ, Gominet M, Lereclus D, et al. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 2002 Dec;184(23):6424-33.
- [183] Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 2008 Sep;10(9):2331-43.
- [184] Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay TL, Foss M, Lau PC, Sanders G, et al. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J Bacteriol* 2006 Jun;188(12):4312-20.
- [185] Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol* 2009 Mar;17(3):109-18.
- [186] Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002 Feb;184(4):1140-54.
- [187] Kim TJ, Young BM, Young GM. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2008 Sep;74(17):5466-74.
- [188] Wood TK, Gonzalez Barrios AF, Herzberg M, Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006 Sep;72(2):361-7.
- [189] Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmee M, Collignon A, Bourlioux P, et al. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (*fliC*) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol* 2000 Sep;38(9):3179-86.
- [190] Tasteyre A, Barc MC, Karjalainen T, Dodson P, Hyde S, Bourlioux P, et al. A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. *Microbiology* 2000 Apr;146 (Pt 4):957-66.
- [191] Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmee M, Collignon A, Bourlioux P, et al. Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol* 2001 Mar;39(3):1178-83.
- [192] Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of *FliC* and *FliD* flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun* 2001 Dec;69(12):7937-40.
- [193] Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, *FliC* and *FliD*, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun* 2011 Oct;79(10):4061-7.
- [194] Twine SM, Reid CW, Aubry A, McMullin DR, Fulton KM, Austin J, et al. Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 2009 Nov;191(22):7050-62.

- [195] Wright A, Wait R, Begum S, Crossett B, Nagy J, Brown K, et al. Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*. *Proteomics* 2005 Jun;5(9):2443-52.
- [196] Emerson JE, Stabler RA, Wren BW, Fairweather NF. Microarray analysis of the transcriptional responses of *Clostridium difficile* to environmental and antibiotic stress. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):757-64.
- [197] Jank T, Aktories K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol* 2008 May;16(5):222-9.
- [198] Davies AH, Roberts AK, Shone CC, Acharya KR. Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins. *Biochem J* 2011 Jun 15;436(3):517-26.
- [199] Genth H, Dreger SC, Huelsenbeck J, Just I. *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(4):592-7.
- [200] Krivan HC, Clark GF, Smith DF, Wilkins TD. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. *Infect Immun* 1986 Sep;53(3):573-81.
- [201] Ho JG, Greco A, Rupnik M, Ng KK. Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 20;102(51):18373-8.
- [202] Teneberg S, Lonnroth I, Torres Lopez JF, Galili U, Halvarsson MO, Angstrom J, et al. Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal alpha 3 Gal beta 4 GlcNAc beta-binding *Clostridium difficile* toxin A, human natural anti alpha-galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* 1996 Sep;6(6):599-609.
- [203] Reinert DJ, Jank T, Aktories K, Schulz GE. Structural basis for the function of *Clostridium difficile* toxin B. *J Mol Biol* 2005 Sep 2;351(5):973-81.
- [204] Rupnik M, Pabst S, von Eichel-Streiber C, Urlaub H, Soling HD. Characterization of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments after limited proteolysis of *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) by host cells. *Microbiology* 2005 Jan;151(Pt 1):199-208.
- [205] Jank T, Reinert DJ, Giesemann T, Schulz GE, Aktories K. Change of the donor substrate specificity of *Clostridium difficile* toxin B by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 2005 Nov 11;280(45):37833-8.
- [206] Shen A, Lupardus PJ, Gersch MM, Puri AW, Albrow VE, Garcia KC, et al. Defining an allosteric circuit in the cysteine protease domain of *Clostridium difficile* toxins. *Nat Struct Mol Biol* 2011 Mar;18(3):364-71.
- [207] Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005 Apr;18(2):247-63.
- [208] Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol* 2012 Jan;20(1):21-9.
- [209] Dupuy B, Sonenshein AL. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol Microbiol* 1998 Jan;27(1):107-20.
- [210] Hammond GA, Lyerly DM, Johnson JL. Transcriptional analysis of the toxigenic element of *Clostridium difficile*. *Microb Pathog* 1997 Mar;22(3):143-54.
- [211] Hundesberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem* 1997 Mar 15;244(3):735-42.
- [212] Mani N, Dupuy B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 May 8;98(10):5844-9.
- [213] Dupuy B, Raffestin S, Matamouros S, Mani N, Popoff MR, Sonenshein AL. Regulation of toxin and bacteriocin gene expression in *Clostridium* by interchangeable RNA polymerase sigma factors. *Mol Microbiol* 2006 May;60(4):1044-57.

- [214] Mani N, Lyras D, Barroso L, Howarth P, Wilkins T, Rood JI, et al. Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. *J Bacteriol* 2002 Nov;184(21):5971-8.
- [215] Matamouros S, England P, Dupuy B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* 2007 Jun;64(5):1274-88.
- [216] Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):685-9.
- [217] Tan KS, Wee BY, Song KP. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2001 Jul;50(7):613-9.
- [218] Govind R, Dupuy B. Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLoS Pathog* 2012 Jun;8(6):e1002727.
- [219] Olling A, Seehase S, Minton NP, Tatge H, Schroter S, Kohlscheen S, et al. Release of TcdA and TcdB from *Clostridium difficile* cdi 630 is not affected by functional inactivation of the tcdE gene. *Microb Pathog* 2012 Jan;52(1):92-100.
- [220] Florin I, Thelestam M. Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1983 Dec 19;763(4):383-92.
- [221] Barth H, Pfeifer G, Hofmann F, Maier E, Benz R, Aktories K. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J Biol Chem* 2001 Apr 6;276(14):10670-6.
- [222] Qa'Dan M, Spyres LM, Ballard JD. pH-induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. *Infect Immun* 2000 May;68(5):2470-4.
- [223] Pfeifer G, Schirmer J, Leemhuis J, Busch C, Meyer DK, Aktories K, et al. Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J Biol Chem* 2003 Nov 7;278(45):44535-41.
- [224] Egerer M, Gieseemann T, Jank T, Satchell KJ, Aktories K. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *J Biol Chem* 2007 Aug 31;282(35):25314-21.
- [225] Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schratzenholz A, et al. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 2007 Mar 22;446(7134):415-9.
- [226] Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, et al. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 1995 Jun 9;270(23):13932-6.
- [227] Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 1995 Jun 8;375(6531):500-3.
- [228] Chen ML, Pothoulakis C, LaMont JT. Protein kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin A. *J Biol Chem* 2002 Feb 8;277(6):4247-54.
- [229] Schmidt M, Rumenapp U, Bienek C, Keller J, von Eichel-Streiber C, Jakobs KH. Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. *J Biol Chem* 1996 Feb 2;271(5):2422-6.
- [230] Shoshan MC, Florin I, Thelestam M. Activation of cellular phospholipase A2 by *Clostridium difficile* toxin B. *J Cell Biochem* 1993 May;52(1):116-24.
- [231] Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, et al. p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 2000 Apr;105(8):1147-56.
- [232] Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, Joshi MA, O'Keane JC, Dickey BF, et al. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J Clin Invest* 1994 Mar;93(3):1257-65.
- [233] Karlsson S, Burman LG, Akerlund T. Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. *Microbiology* 2008 Nov;154(Pt 11):3430-6.

- [234] Antunes A, Martin-Verstraete I, Dupuy B. CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. *Mol Microbiol* 2011 Feb;79(4):882-99.
- [235] Ikeda D, Karasawa T, Yamakawa K, Tanaka R, Namiki M, Nakamura S. Effect of isoleucine on toxin production by *Clostridium difficile* in a defined medium. *Zentralbl Bakteriol* 1998 May;287(4):375-86.
- [236] Karasawa T, Maegawa T, Nojiri T, Yamakawa K, Nakamura S. Effect of arginine on toxin production by *Clostridium difficile* in defined medium. *Microbiol Immunol* 1997;41(8):581-5.
- [237] Yamakawa K, Kamiya S, Meng XQ, Karasawa T, Nakamura S. Toxin production by *Clostridium difficile* in a defined medium with limited amino acids. *J Med Microbiol* 1994 Nov;41(5):319-23.
- [238] Karlsson S, Burman LG, Akerlund T. Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiology* 1999 Jul;145 (Pt 7):1683-93.
- [239] Karlsson S, Lindberg A, Norin E, Burman LG, Akerlund T. Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 2000 Oct;68(10):5881-8.
- [240] Yamakawa K, Karasawa T, Ikoma S, Nakamura S. Enhancement of *Clostridium difficile* toxin production in biotin-limited conditions. *J Med Microbiol* 1996 Feb;44(2):111-4.
- [241] Maegawa T, Karasawa T, Ohta T, Wang X, Kato H, Hayashi H, et al. Linkage between toxin production and purine biosynthesis in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2002 Jan;51(1):34-41.
- [242] Karlsson S, Dupuy B, Mukherjee K, Norin E, Burman LG, Akerlund T. Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infect Immun* 2003 Apr;71(4):1784-93.
- [243] Onderdonk AB, Lowe BR, Bartlett JG. Effect of environmental stress on *Clostridium difficile* toxin levels during continuous cultivation. *Appl Environ Microbiol* 1979 Oct;38(4):637-41.
- [244] Gerber M, Walch C, Loffler B, Tischendorf K, Reischl U, Ackermann G. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):776-83.
- [245] Barc MC, Depitre C, Corthier G, Collignon A, Su WJ, Bourlioux P. Effects of antibiotics and other drugs on toxin production in *Clostridium difficile* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1992 Jun;36(6):1332-5.
- [246] Nakamura S, Mikawa M, Tanabe N, Yamakawa K, Nishida S. Effect of clindamycin on cytotoxin production by *Clostridium difficile*. *Microbiol Immunol* 1982;26(11):985-92.
- [247] Drummond LJ, Smith DG, Poxton IR. Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2003 Dec;52(Pt 12):1033-8.
- [248] Dineen SS, Villapakkam AC, Nordman JT, Sonenshein AL. Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol Microbiol* 2007 Oct;66(1):206-19.
- [249] Dineen SS, McBride SM, Sonenshein AL. Integration of metabolism and virulence by *Clostridium difficile* CodY. *J Bacteriol* 2010 Oct;192(20):5350-62.
- [250] Antunes A, Camiade E, Monot M, Courtois E, Barbut F, Sernova NV, et al. Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. *Nucleic Acids Res* 2012 Sep 18.
- [251] Kamiya S, Ogura H, Meng XQ, Nakamura S. Correlation between cytotoxin production and sporulation in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 1992 Sep;37(3):206-10.
- [252] Saujet L, Monot M, Dupuy B, Soutourina O, Martin-Verstraete I. The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 2011 Jul;193(13):3186-96.
- [253] Underwood S, Guan S, Vijayashubhash V, Baines SD, Graham L, Lewis RJ, et al. Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *J Bacteriol* 2009 Dec;191(23):7296-305.

- [254] Stabler RA, He M, Dawson L, Martin M, Valiente E, Corton C, et al. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* O27 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol* 2009;10(9):R102.
- [255] Carter GP, Purdy D, Williams P, Minton NP. Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a luxS-type signalling system. *J Med Microbiol* 2005 Feb;54(Pt 2):119-27.
- [256] Lee AS, Song KP. LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Sep 30;335(3):659-66.
- [257] Lima AA, Lyerly DM, Wilkins TD, Innes DJ, Guerrant RL. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infect Immun* 1988 Mar;56(3):582-8.
- [258] Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 1985 Feb;47(2):349-52.
- [259] Mitchell TJ, Ketley JM, Haslam SC, Stephen J, Burdon DW, Candy DC, et al. Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut* 1986 Jan;27(1):78-85.
- [260] Corthier G, Muller MC, Wilkins TD, Lyerly D, L'Haridon R. Protection against experimental pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 1991 Mar;59(3):1192-5.
- [261] Kim PH, Iaconis JP, Rolfe RD. Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocolitis and transfer of protection to infant hamsters. *Infect Immun* 1987 Dec;55(12):2984-92.
- [262] Torres JF. Purification and characterisation of toxin B from a strain of *Clostridium difficile* that does not produce toxin A. *J Med Microbiol* 1991 Jul;35(1):40-4.
- [263] Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 2000 Jul;38(7):2706-14.
- [264] Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD, Depitre C, Corthier G. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 1992 Nov;60(11):4633-9.
- [265] Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int J Infect Dis* 2007 Jan;11(1):5-10.
- [266] Savidge TC, Pan WH, Newman P, O'Brien M, Anton PM, Pothoulakis C. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* 2003 Aug;125(2):413-20.
- [267] Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, et al. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 2009 Apr 30;458(7242):1176-9.
- [268] Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 2010 Oct 7;467(7316):711-3.
- [269] Carter GP, Awad MM, Kelly ML, Rood JI, Lyras D. TcdB or not TcdB: a tale of two *Clostridium difficile* toxins. *Future Microbiol* 2011 Feb;6(2):121-3.
- [270] Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 1988 Sep;56(9):2299-306.
- [271] Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, et al. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J Bacteriol* 2007 Oct;189(20):7290-301.
- [272] Rupnik M, Grabnar M, Geric B. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 2003 Dec;9(6):289-94.
- [273] Goncalves C, Decre D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004 May;42(5):1933-9.

- [274] McEllistrem MC, Carman RJ, Gerding DN, Genheimer CW, Zheng L. A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes. *Clin Infect Dis* 2005 Jan 15;40(2):265-72.
- [275] Barbut F, Decre D, Lalande V, Burghoffer B, Noussair L, Gigandon A, et al. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol* 2005 Feb;54(Pt 2):181-5.
- [276] Geric B, Carman RJ, Rupnik M, Genheimer CW, Sambol SP, Lyerly DM, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis* 2006 Apr 15;193(8):1143-50.
- [277] Sundriyal A, Roberts AK, Ling R, McGlashan J, Shone CC, Acharya KR. Expression, purification and cell cytotoxicity of actin-modifying binary toxin from *Clostridium difficile*. *Protein Expr Purif* 2010 Nov;74(1):42-8.
- [278] Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD, et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog* 2009 Oct;5(10):e1000626.
- [279] Bacci S, Molbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis* 2011 Jun;17(6):976-82.
- [280] Kaiser E, Kroll C, Ernst K, Schwan C, Popoff M, Fischer G, et al. Membrane translocation of binary actin-ADP-ribosylating toxins from *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* is facilitated by cyclophilin A and Hsp90. *Infect Immun* 2011 Oct;79(10):3913-21.
- [281] Gulke I, Pfeifer G, Liese J, Fritz M, Hofmann F, Aktories K, et al. Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 2001 Oct;69(10):6004-11.
- [282] Wilson KH, Kennedy MJ, Fekety FR. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1982 Mar;15(3):443-6.
- [283] Wilson KH. Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *J Clin Microbiol* 1983 Oct;18(4):1017-9.
- [284] Sorg JA, Sonenshein AL. Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol* 2008 Apr;190(7):2505-12.
- [285] Sorg JA, Sonenshein AL. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol* 2009 Feb;191(3):1115-7.
- [286] Heeg D, Burns DA, Cartman ST, Minton NP. Spores of *Clostridium difficile* clinical isolates display a diverse germination response to bile salts. *PLoS One* 2012;7(2):e32381.
- [287] Lawley TD, Croucher NJ, Yu L, Clare S, Sebahia M, Goulding D, et al. Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *J Bacteriol* 2009 Sep;191(17):5377-86.
- [288] Permpoonpattana P, Tolls EH, Nadem R, Tan S, Brisson A, Cutting SM. Surface layers of *Clostridium difficile* endospores. *J Bacteriol* 2011 Dec;193(23):6461-70.
- [289] Haraldsen JD, Sonenshein AL. Efficient sporulation in *Clostridium difficile* requires disruption of the sigmaK gene. *Mol Microbiol* 2003 May;48(3):811-21.
- [290] Burns DA, Heap JT, Minton NP. SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate. *J Bacteriol* 2010 Feb;192(3):657-64.
- [291] Hafiz S, Oakley CL. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *J Med Microbiol* 1976 May;9(2):129-36.
- [292] Dawson LF, Stabler RA, Wren BW. Assessing the role of p-cresol tolerance in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):745-9.

- [293] Dawson LF, Donahue EH, Cartman ST, Barton RH, Bundy J, McNerney R, et al. The analysis of para-cresol production and tolerance in *Clostridium difficile* 027 and 012 strains. *BMC Microbiol* 2011;11:86.
- [294] Selmer T, Andrei PI. p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycy radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. *Eur J Biochem* 2001 Mar;268(5):1363-72.
- [295] Andrei PI, Pierik AJ, Zauner S, Andrei-Selmer LC, Selmer T. Subunit composition of the glycy radical enzyme p-hydroxyphenylacetate decarboxylase. A small subunit, HpdC, is essential for catalytic activity. *Eur J Biochem* 2004 Jun;271(11):2225-30.
- [296] Ho TD, Ellermeier CD. PrsW is required for colonization, resistance to antimicrobial peptides, and expression of extracytoplasmic function sigma factors in *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 2011 Aug;79(8):3229-38.
- [297] McBride SM, Sonenshein AL. Identification of a genetic locus responsible for antimicrobial peptide resistance in *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 2011 Jan;79(1):167-76.
- [298] McBride SM, Sonenshein AL. The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology* 2011 May;157(Pt 5):1457-65.
- [299] Miura M, Kato H, Matsushita O. Identification of a novel virulence factor in *Clostridium difficile* that modulates toxin sensitivity of cultured epithelial cells. *Infect Immun* 2011 Sep;79(9):3810-20.
- [300] Kreitman RJ, Pastan I. Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J* 1995 Apr 1;307 (Pt 1):29-37.
- [301] Lencer WI, Constable C, Moe S, Jobling MG, Webb HM, Ruston S, et al. Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* 1995 Nov;131(4):951-62.
- [302] McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005 Dec 8;353(23):2433-41.
- [303] Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML, et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* 2008 Jul 31;13(31).
- [304] Cheng VC, Yam WC, Chan JF, To KK, Ho PL, Yuen KY. *Clostridium difficile* ribotype 027 arrives in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agents* 2009 Nov;34(5):492-3.
- [305] Kato H, Ito Y, van den Berg RJ, Kuijper EJ, Arakawa Y. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill* 2007 Jan;12(1):E070111 3.
- [306] Kim H, Lee Y, Moon HW, Lim CS, Lee K, Chong Y. Emergence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in Korea. *Korean J Lab Med* 2011 Jul;31(3):191-6.
- [307] Riley TV, Thean S, Hool G, Golledge CL. First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027. *Med J Aust* 2009 Jun 15;190(12):706-8.
- [308] M Tachon; C Cattoen KB, I Poujol, A Carbonne, F Barbut, JC Petit, B Coignard. First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report. *Euro Surveill* 2006;11(18).
- [309] Birgand G, Blanckaert K, Carbonne A, Coignard B, Barbut F, Eckert C, et al. Investigation of a large outbreak of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 infections in northern France, 2006-2007 and associated clusters in 2008-2009. *Euro Surveill* 2010 Jun 24;15(25).
- [310] P. Boquet; N. Marty; J.P. Carlier; J.C. Desenclos BCFBKBMTACIPVLLLFMHM. Actualités des infections digestives à *Clostridium difficile*, France, 2007. *Revue Francophone des Laboratoires* 2007;396.
- [311] Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, Drudy D, Brazier JS, Trinh HT, et al. Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *J Bacteriol* 2006 Oct;188(20):7297-305.

- [312] He M, Sebahia M, Lawley TD, Stabler RA, Dawson LF, Martin MJ, et al. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Apr 20;107(16):7527-32.
- [313] Scaria J, Ponnala L, Janvilisri T, Yan W, Mueller LA, Chang YF. Analysis of ultra low genome conservation in *Clostridium difficile*. *PLoS One* 2010;5(12):e15147.
- [314] Stabler RA, Valiente E, Dawson LF, He M, Parkhill J, Wren BW. In-depth genetic analysis of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 strains reveals high genome fluidity including point mutations and inversions. *Gut Microbes* 2010 Jul;1(4):269-76.
- [315] Marsden GL, Davis IJ, Wright VJ, Sebahia M, Kuijper EJ, Minton NP. Array comparative hybridisation reveals a high degree of similarity between UK and European clinical isolates of hypervirulent *Clostridium difficile*. *BMC Genomics* 2010;11:389.
- [316] Forgetta V, Oughton MT, Marquis P, Brukner I, Blanchette R, Haub K, et al. Fourteen-genome comparison identifies DNA markers for severe-disease-associated strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2011 Jun;49(6):2230-8.
- [317] Knetsch CW, Hensgens MP, Harmanus C, van der Bijl MW, Savelkoul PH, Kuijper EJ, et al. Genetic markers for *Clostridium difficile* lineages linked to hypervirulence. *Microbiology* 2011 Nov;157(Pt 11):3113-23.
- [318] Spigaglia P, Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2002 Sep;40(9):3470-5.
- [319] MacCannell DR, Louie TJ, Gregson DB, Laverdiere M, Labbe AC, Laing F, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. *J Clin Microbiol* 2006 Jun;44(6):2147-52.
- [320] Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. tcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2007 Jan;45(1):215-21.
- [321] Murray R, Boyd D, Levett PN, Mulvey MR, Alfa MJ. Truncation in the tcdC region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC Infect Dis* 2009;9:103.
- [322] Goldenberg SD, French GL. Lack of association of tcdC type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. *J Infect* 2011 May;62(5):355-62.
- [323] Verdoorn BP, Orenstein R, Rosenblatt JE, Sloan LM, Schleck CD, Harmsen WS, et al. High prevalence of tcdC deletion-carrying *Clostridium difficile* and lack of association with disease severity. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 Jan;66(1):24-8.
- [324] Carter GP, Douce GR, Govind R, Howarth PM, Mackin KE, Spencer J, et al. The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog* 2011 Oct;7(10):e1002317.
- [325] Stabler RA, Dawson LF, Phua LT, Wren BW. Comparative analysis of BI/NAP1/027 hypervirulent strains reveals novel toxin B-encoding gene (tcdB) sequences. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):771-5.
- [326] Lanis JM, Barua S, Ballard JD. Variations in TcdB activity and the hypervirulence of emerging strains of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog* 2010;6(8):e1001061.
- [327] Lanis JM, Hightower LD, Shen A, Ballard JD. TcdB from hypervirulent *Clostridium difficile* exhibits increased efficiency of autoprocessing. *Mol Microbiol* 2012 Apr;84(1):66-76.
- [328] Akerlund T, Persson I, Unemo M, Noren T, Svenungsson B, Wullt M, et al. Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1. *J Clin Microbiol* 2008 Apr;46(4):1530-3.
- [329] Wilcox MH, Fawley WN. Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. *Lancet* 2000 Oct 14;356(9238):1324.

- [330] Vohra P, Poxton IR. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology* 2011 May;157(Pt 5):1343-53.
- [331] Burns DA, Heap JT, Minton NP. The diverse sporulation characteristics of *Clostridium difficile* clinical isolates are not associated with type. *Anaerobe* 2010 Dec;16(6):618-22.
- [332] Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP. Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027. *PLoS One* 2011;6(9):e24894.
- [333] Burns DA, Minton NP. Sporulation studies in *Clostridium difficile*. *J Microbiol Methods* 2011 Nov;87(2):133-8.
- [334] Pepin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 2005 Nov 1;41(9):1254-60.
- [335] Razavi B, Apisarnthanarak A, Mundy LM. *Clostridium difficile*: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance. *Infection* 2007 Oct;35(5):300-7.
- [336] Bourgault AM, Lamothe F, Loo VG, Poirier L. In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Oct;50(10):3473-5.
- [337] Drudy D, Quinn T, O'Mahony R, Kyne L, O'Gaora P, Fanning S. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in *gyrB* in toxin-A-negative, toxin-B-positive *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 2006 Dec;58(6):1264-7.
- [338] Drudy D, Kyne L, O'Mahony R, Fanning S. *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* PCR-027. *Emerg Infect Dis* 2007 Mar;13(3):504-5.
- [339] Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. Surface layer protein A variant of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027. *Emerg Infect Dis* 2011 Feb;17(2):317-9.
- [340] Spigaglia P, Galeotti CL, Barbanti F, Scarselli M, Van Broeck J, Mastrantonio P. The LMW surface-layer proteins of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 share common immunogenic properties. *J Med Microbiol* 2011 Aug;60(Pt 8):1168-73.
- [341] Bianco M, Fedele G, Quattrini A, Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, et al. Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol* 2011 Aug;60(Pt 8):1162-7.
- [342] Brazier JS, Patel B, Pearson A. Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in British hospitals. *Euro Surveill* 2007 Apr;12(4):E070426 2.
- [343] Indra A, Schmid D, Huhulescu S, Hell M, Gattringer R, Hasenberger P, et al. Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006-2007. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):702-8.
- [344] Borgmann S, Kist M, Jakobiak T, Reil M, Scholz E, von Eichel-Streiber C, et al. Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. *Euro Surveill* 2008 Dec 4;13(49).
- [345] Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM, Mastrantonio P. *Clostridium difficile* isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: emergence of PCR ribotype 018. *J Clin Microbiol* 2010 Aug;48(8):2892-6.
- [346] Kim H, Riley TV, Kim M, Kim CK, Yong D, Lee K, et al. Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 2008 Mar;46(3):1116-7.
- [347] Shin BM, Kuak EY, Yoo HM, Kim EC, Lee K, Kang JO, et al. Multicentre study of the prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* in Korea: results of a retrospective study 2000-2005. *J Med Microbiol* 2008 Jun;57(Pt 6):697-701.
- [348] Cheknis AK, Sambol SP, Davidson DM, Nagaro KJ, Mancini MC, Hidalgo-Arroyo GA, et al. Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005-2007. *Anaerobe* 2009 Dec;15(6):230-3.

- [349] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011 Jan 1;377(9759):63-73.
- [350] Goorhuis A, Debast SB, van Leengoed LA, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, et al. Clostridium difficile PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? J Clin Microbiol 2008 Mar;46(3):1157; author reply 8.
- [351] Weese JS, Wakeford T, Reid-Smith R, Rousseau J, Friendship R. Longitudinal investigation of Clostridium difficile shedding in piglets. Anaerobe 2010 Oct;16(5):501-4.
- [352] Rupnik M, Widmer A, Zimmermann O, Eckert C, Barbut F. Clostridium difficile toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. J Clin Microbiol 2008 Jun;46(6):2146.
- [353] Debast SB, van Leengoed LA, Goorhuis A, Harmanus C, Kuijper EJ, Bergwerff AA. Clostridium difficile PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. Environ Microbiol 2009 Feb;11(2):505-11.
- [354] Bakker D, Corver J, Harmanus C, Goorhuis A, Keessen EC, Fawley WN, et al. Relatedness of human and animal Clostridium difficile PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance. J Clin Microbiol 2010 Oct;48(10):3744-9.
- [355] Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, et al. Toxinotype V Clostridium difficile in humans and food animals. Emerg Infect Dis 2008 Jul;14(7):1039-45.
- [356] Valiente E, Dawson LF, Cairns MD, Stabler RA, Wren BW. Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent Clostridium difficile 027 lineage. J Med Microbiol 2012 Jan;61(Pt 1):49-56.
- [357] Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP. The emergence of 'hypervirulence' in Clostridium difficile. International journal of medical microbiology : IJMM 2010 Aug;300(6):387-95.
- [358] Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of Clostridium difficile: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. Journal of clinical microbiology 2008 Feb;46(2):431-7.
- [359] Calabi E, Fairweather N. Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in Clostridium difficile. Journal of bacteriology 2002 Jul;184(14):3886-97.
- [360] Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T. Characterization of a cell surface protein of Clostridium difficile with adhesive properties. Infection and immunity 2001 Apr;69(4):2144-53.
- [361] O'Neil HS, Marquis H. Listeria monocytogenes flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. Infection and immunity 2006 Dec;74(12):6675-81.
- [362] Ormonde P, Horstedt P, O'Toole R, Milton DL. Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by Vibrio anguillarum. Journal of bacteriology 2000 Apr;182(8):2326-8.
- [363] Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes. Infection and immunity 1996 Jul;64(7):2445-8.
- [364] Giron JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells. Molecular microbiology 2002 Apr;44(2):361-79.
- [365] Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The Pseudomonas aeruginosa flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. Infection and immunity 1998 Mar;66(3):1000-7.
- [366] Young GM, Schmiel DH, Miller VL. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999 May 25;96(11):6456-61.
- [367] Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, et al. Secretion of virulence proteins from Campylobacter jejuni is dependent on a functional flagellar export apparatus. Journal of bacteriology 2004 Jun;186(11):3296-303.

- [368] Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and immunity* 2011 Oct;79(10):4061-7.
- [369] Purdy D, O'Keefe TA, Elmore M, Herbert M, McLeod A, Bokori-Brown M, et al. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. *Molecular microbiology* 2002 Oct;46(2):439-52.
- [370] Hussain HA, Roberts AP, Mullany P. Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630Deltaerm) and demonstration that the conjugative transposon Tn916DeltaE enters the genome of this strain at multiple sites. *J Med Microbiol* 2005 Feb;54(Pt 2):137-41.
- [371] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Methods* 2009 Jul;78(1):79-85.
- [372] Heap JT, Kuehne SA, Ehsaan M, Cartman ST, Cooksley CM, Scott JC, et al. The Clostron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of Microbiological Methods* 2010 Jan;80(1):49-55.
- [373] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning - a Laboratory Manual*. 3 ed. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour, Laboratory Press, 2001.
- [374] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP. The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods* 2007 Sep;70(3):452-64.
- [375] Rashid MH, Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of bacteriology* 2000 Jan;182(1):225-7.
- [376] Barketi-Klai A, Hoys S, Lambert-Bordes S, Collignon A, Kansau I. Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. *Journal of medical microbiology* 2011 Aug;60(Pt 8):1155-61.
- [377] Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD. Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. *Journal of clinical microbiology* 1991 Nov;29(11):2639-42.
- [378] Lane MC, Lockett V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, et al. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infection and immunity* 2005 Nov;73(11):7644-56.
- [379] Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infection and immunity* 2005 Nov;73(11):7657-68.
- [380] Aubry A, Hussack G, Chen W, KuoLee R, Twine SM, Fulton KM, et al. Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity* 2012.
- [381] Collignon A. Methods for working with the mouse model. *Methods Mol Biol* 2010;646:229-37.
- [382] Onderdonk AB, Cisneros RL, Bartlett JG. *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. *Infect Immun* 1980 Apr;28(1):277-82.
- [383] Castex F, Jouvert S, Bastide M, Corthier G. Kinetics of appearance of intestinal lesions in mice mono-associated with a lethal or non-lethal strain of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 1994 Feb;40(2):102-9.
- [384] Vernet A, Corthier G, Dubos-Ramare F, Parodi AL. Relationship between levels of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B and cecal lesions in gnotobiotic mice. *Infect Immun* 1989 Jul;57(7):2123-7.
- [385] Corthier G, Dubos F, Raibaud P. Modulation of cytotoxin production by *Clostridium difficile* in the intestinal tracts of gnotobiotic mice inoculated with various human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1985 Jan;49(1):250-2.
- [386] Corthier G, Dubos F, Ducluzeau R. Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol* 1986 Nov;32(11):894-6.
- [387] Laffaire J. Modifications du transcriptome au cours du développement postnatal du cervelet dans un modèle murin de Trisomie 21. Thèse à l'université Paris VI Pierre et Marie Curie, 2008.

- [388] Smyth GK, Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 2003 Dec;31(4):265-73.
- [389] Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007;8(2):R19.
- [390] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
- [391] Boetzkes A, Felkel KW, Zeiser J, Jochim N, Just I, Pich A. Secretome analysis of *Clostridium difficile* strains. *Arch Microbiol* 2012 Mar 8.
- [392] Lu HM, Motley ST, Lory S. Interactions of the components of the general secretion pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunits in complex formation and extracellular protein secretion. *Mol Microbiol* 1997 Jul;25(2):247-59.
- [393] Wolfgang M, Lauer P, Park HS, Brossay L, Hebert J, Koomey M. PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in pilated *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1998 Jul;29(1):321-30.
- [394] Wall D, Kaiser D. Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 1999 Apr;32(1):1-10.
- [395] Shi W, Sun H. Type IV pilus-dependent motility and its possible role in bacterial pathogenesis. *Infect Immun* 2002 Jan;70(1):1-4.
- [396] O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998 Oct;30(2):295-304.
- [397] Merz AJ, Enns CA, So M. Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* 1999 Jun;32(6):1316-32.
- [398] Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun* 2011 Feb;79(2):548-61.
- [399] Logan SM. Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire? *Microbiology* 2006 May;152(Pt 5):1249-62.
- [400] Morohoshi T, Yokoyama Y, Ouchi M, Kato N, Ikeda T. Motility and the expression of the flagellin protein *FliC* are negatively regulated by quorum sensing in *Edwardsiella tarda*. *J Biosci Bioeng* 2009 Oct;108(4):314-8.
- [401] Hahn MY, Raman S, Anaya M, Husson RN. The *Mycobacterium tuberculosis* extracytoplasmic-function sigma factor *SigL* regulates polyketide synthases and secreted or membrane proteins and is required for virulence. *J Bacteriol* 2005 Oct;187(20):7062-71.
- [402] Kovacicova G, Skorupski K. The alternative sigma factor sigma(E) plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 2002 Oct;70(10):5355-62.
- [403] Crouch ML, Becker LA, Bang IS, Tanabe H, Ouellette AJ, Fang FC. The alternative sigma factor sigma is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to anti-microbial peptides. *Mol Microbiol* 2005 May;56(3):789-99.
- [404] Testerman TL, Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Libby SJ, Fang FC. The alternative sigma factor sigmaE controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol Microbiol* 2002 Feb;43(3):771-82.
- [405] Sun R, Converse PJ, Ko C, Tyagi S, Morrison NE, Bishai WR. *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Mol Microbiol* 2004 Apr;52(1):25-38.
- [406] Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 2006 Apr;9(2):143-52.
- [407] Hoch JA, Varughese KI. Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol* 2001 Sep;183(17):4941-9.
- [408] Maddocks SE, Oyston PC. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 2008 Dec;154(Pt 12):3609-23.

- [409] Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997 Dec;61(4):393-410.
- [410] Brouwer MS, Warburton PJ, Roberts AP, Mullany P, Allan E. Genetic organisation, mobility and predicted functions of genes on integrated, mobile genetic elements in sequenced strains of *Clostridium difficile*. *PLoS One* 2011;6(8):e23014.
- [411] Van Melderen L. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr Opin Microbiol* 2010 Dec;13(6):781-5.
- [412] Hu MX, Zhang X, Li EL, Feng YJ. Recent advancements in toxin and antitoxin systems involved in bacterial programmed cell death. *Int J Microbiol* 2010;2010:781430.
- [413] Rothenbacher FP, Suzuki M, Hurley JM, Montville TJ, Kirn TJ, Ouyang M, et al. *Clostridium difficile* MazF toxin exhibits selective, not global, mRNA cleavage. *J Bacteriol* 2012 Apr 27.
- [414] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002 Mar;43(6):1565-75.
- [415] Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS* 2002;6(1):23-33.
- [416] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005 Feb;60(2):174-82.
- [417] Vale PF, Little TJ. CRISPR-mediated phage resistance and the ghost of coevolution past. *Proc Biol Sci* 2010 Jul 22;277(1691):2097-103.
- [418] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010 Jan 8;327(5962):167-70.
- [419] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 2008 Mar;6(3):181-6.
- [420] Nale JY, Shan J, Hickenbotham PT, Fawley WN, Wilcox MH, Clokie MR. Diverse Temperate Bacteriophage Carriage in *Clostridium difficile* O27 Strains. *PLoS One* 2012;7(5):e37263.
- [421] Sekulovic O, Meessen-Pinard M, Fortier LC. Prophage-stimulated toxin production in *Clostridium difficile* NAP1/O27 lysogens. *J Bacteriol* 2011 Jun;193(11):2726-34.
- [422] Loessner MJ. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* 2005 Aug;8(4):480-7.
- [423] Detmers FJ, Lanfermeijer FC, Poolman B. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res Microbiol* 2001 Apr-May;152(3-4):245-58.
- [424] Lazazzera BA. The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides* 2001 Oct;22(10):1519-27.
- [425] Prescott JHDKL. *Microbiologie*. Editor: de boeck. Publisher: MacGraw-Hill. 2002
- [426] Hu KY, Saier MH, Jr. Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res Microbiol* 2002 Sep;153(7):405-15.
- [427] Mitchell WJ, Reizer J, Herring C, Hoischen C, Saier MH, Jr. Identification of a phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system (fructose-1-phosphate forming) in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 1993 May;175(9):2758-61.
- [428] Parr TR, Jr., Saier MH, Jr. The bacterial phosphotransferase system as a potential vehicle for the entry of novel antibiotics. *Res Microbiol* 1992 Jun;143(5):443-7.
- [429] Poncet S, Milohanic E, Maze A, Nait Abdallah J, Ake F, Larribe M, et al. Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol* 2009;16:88-102.
- [430] Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998 Mar;62(1):1-34.
- [431] Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biomaterials* 2006 Apr;19(2):143-57.

- [432] Konings WN. Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2006 Nov;90(4):325-42.
- [433] Horlacher R, Uhland K, Klein W, Ehrmann M, Boos W. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996 Nov;178(21):6250-7.
- [434] Strom AR, Kaasen I. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol* 1993 Apr;8(2):205-10.
- [435] Dong C, Major LL, Srikannathasan V, Errey JC, Giraud MF, Lam JS, et al. RmlC, a C3' and C5' carbohydrate epimerase, appears to operate via an intermediate with an unusual twist boat conformation. *J Mol Biol* 2007 Jan 5;365(1):146-59.
- [436] Tsukioka Y, Yamashita Y, Oho T, Nakano Y, Koga T. Biological function of the dTDP-rhamnose synthesis pathway in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 1997 Feb;179(4):1126-34.
- [437] Yamashita Y, Tomihisa K, Nakano Y, Shimazaki Y, Oho T, Koga T. Recombination between *gtfB* and *gtfC* is required for survival of a dTDP-rhamnose synthesis-deficient mutant of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Infect Immun* 1999 Jul;67(7):3693-7.
- [438] Huang IH, Waters M, Grau RR, Sarker MR. Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiol Lett* 2004 Apr 15;233(2):233-40.
- [439] Lereclus D, Agaisse H, Grandvalet C, Salamitou S, Gominet M. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol* 2000 Oct;290(4-5):295-9.
- [440] Saile E, Koehler TM. Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator *abrB*. *J Bacteriol* 2002 Jan;184(2):370-80.
- [441] Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2005 Dec;3(12):969-78.
- [442] Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Liu JS, et al. The *Spo0A* regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2003 Dec;50(5):1683-701.
- [443] Sugawara Y, Matsumura T, Takegahara Y, Jin Y, Tsukasaki Y, Takeichi M, et al. Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J Cell Biol* 2010 May 17;189(4):691-700.
- [444] Fujinaga Y, Matsumura T, Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y. A novel function of botulinum toxin-associated proteins: HA proteins disrupt intestinal epithelial barrier to increase toxin absorption. *Toxicon* 2009 Oct;54(5):583-6.
- [445] Matsumura T, Jin Y, Kabumoto Y, Takegahara Y, Oguma K, Lencer WI, et al. The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell Microbiol* 2008 Feb;10(2):355-64.
- [446] Deneve C. Impact des conditions environnementales sur l'expression des protéines de surface de *Clostridium difficile* : influence sur le processus de colonisation. Thèse en microbiologie. Faculté de pharmacie Châtenay Malabry Paris-Sud 11, 2008.
- [447] Wosten MM. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* 1998 Sep;22(3):127-50.
- [448] Merrick MJ. In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* 1993 Dec;10(5):903-9.
- [449] Denève-Larrazet C. Impact des conditions environnementales sur l'expression des protéines de surface de *Clostridium difficile*: influence sur le processus de colonisation. France: Université Paris-Sud 11; 2008.
- [450] Stephenson K, Lewis RJ. Molecular insights into the initiation of sporulation in Gram-positive bacteria: new technologies for an old phenomenon. *FEMS Microbiol Rev* 2005 Apr;29(2):281-301.
- [451] Paredes-Sabja D, Sarker MR. Adherence of *Clostridium difficile* spores to Caco-2 cells in culture. *J Med Microbiol* 2012 May 17.

- [452] Arrecubieta C, Matsunaga I, Asai T, Naka Y, Deng MC, Lowy FD. Vaccination with clumping factor A and fibronectin binding protein A to prevent *Staphylococcus aureus* infection of an aortic patch in mice. *J Infect Dis* 2008 Aug 15;198(4):571-5.
- [453] Guzman CA, Talay SR, Molinari G, Medina E, Chhatwal GS. Protective immune response against *Streptococcus pyogenes* in mice after intranasal vaccination with the fibronectin-binding protein SfbI. *J Infect Dis* 1999 Apr;179(4):901-6.
- [454] Hu C, Gong R, Guo A, Chen H. Protective effect of ligand-binding domain of fibronectin-binding protein on mastitis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. *Vaccine* 2010 May 28;28(24):4038-44.
- [455] Kawabata S, Kunitomo E, Terao Y, Nakagawa I, Kikuchi K, Totsuka K, et al. Systemic and mucosal immunizations with fibronectin-binding protein FBP54 induce protective immune responses against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice. *Infect Immun* 2001 Feb;69(2):924-30.
- [456] Olive C, Schulze K, Sun HK, Ebensen T, Horvath A, Toth I, et al. Enhanced protection against *Streptococcus pyogenes* infection by intranasal vaccination with a dual antigen component M protein/SfbI lipid core peptide vaccine formulation. *Vaccine* 2007 Feb 26;25(10):1789-97.
- [457] Schulze K, Medina E, Chhatwal GS, Guzman CA. Stimulation of long-lasting protection against *Streptococcus pyogenes* after intranasal vaccination with non adjuvanted fibronectin-binding domain of the SfbI protein. *Vaccine* 2003 May 16;21(17-18):1958-64.
- [458] Terao Y, Okamoto S, Kataoka K, Hamada S, Kawabata S. Protective immunity against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice after immunization with fibronectin-binding protein. *J Infect Dis* 2005 Dec 15;192(12):2081-91.
- [459] Aubry A, Hussack G, Chen W, Kuolee R, Twine SM, Fulton KM, et al. Modulation of Toxin Production by the Flagellar Regulon in *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 2012 Oct;80(10):3521-32.
- [460] Deakin LJ, Clare S, Fagan RP, Dawson LF, Pickard DJ, West MR, et al. The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun* 2012 Aug;80(8):2704-11.
- [461] Gardel CL, Mekalanos JJ. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect Immun* 1996 Jun;64(6):2246-55.
- [462] Ghosh A, Paul K, Chowdhury R. Role of the histone-like nucleoid structuring protein in colonization, motility, and bile-dependent repression of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 2006 May;74(5):3060-4.
- [463] Silva AJ, Leitch GJ, Camilli A, Benitez JA. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera. *Infect Immun* 2006 Apr;74(4):2072-9.
- [464] Syed KA, Beyhan S, Correa N, Queen J, Liu J, Peng F, et al. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J Bacteriol* 2009 Nov;191(21):6555-70.
- [465] Carrillo CD, Taboada E, Nash JH, Lanthier P, Kelly J, Lau PC, et al. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA. *J Biol Chem* 2004 May 7;279(19):20327-38.
- [466] Batah J. JP-A, Collignon A., and Kansau I. . Flagella and flagellin of *C. difficile* 027 hypervirulent strain activate NF- κ B and elicit IL-8 production in epithelial TLR-5-expressing cell line. Oral presentation in 4th international clostridium difficile symposium. Bled-Slovenia. 2012
- [467] Jolivot P-A. CA, and Kansau I. . Flagellin of *C. difficile* 027 hypervirulent strain activates ERK1/2 MAPK in epithelial TLR-5-expressing cell line. Poster in 7th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia - ClostPath, Iowa-USA. 2011

ANNEXE

Annexe I. Liste des gènes spécifiques à la souche R20291 selon Stabler et coll. [254]

<u>R20291</u>	Fonction
CDR20291_0183	Putative membrane protein
CDR20291_1419	Uncharacterized protein
CDR20291_1744	Site-specific recombinase
CDR20291_1745	Uncharacterized protein
CDR20291_1746	Uncharacterized protein
CDR20291_1747	Putative conjugative transposon regulatory protein
CDR20291_1748	Two-component response regulator
CDR20291_1749	Sensor protein
CDR20291_1750	Putative lantibiotic ABC transporter, ATP-binding protein
CDR20291_1751	Putative lantibiotic ABC transporter, permease protein
CDR20291_1752	Putative lantibiotic ABC transporter, permease protein
CDR20291_1753	Uncharacterized protein
CDR20291_1754	RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily
CDR20291_1755	Sigma-24 (feci)
CDR20291_1756	RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily
CDR20291_1757	Uncharacterized protein
CDR20291_1758	Uncharacterized protein
CDR20291_1759	Addiction module toxin, RelE/StbE family
CDR20291_1760	Addiction module antitoxin, RelB/DinJ family
CDR20291_1761	Uncharacterized protein
CDR20291_1762	Phage protein
CDR20291_1763	Replicative DNA helicase
CDR20291_1764	Uncharacterized protein
CDR20291_1765	Uncharacterized protein
CDR20291_1766	Transcription regulator (yobD protein)
CDR20291_1767	Uncharacterized protein
CDR20291_1768	Uncharacterized protein
CDR20291_1769	Uncharacterized protein
CDR20291_1770	Uncharacterized protein
CDR20291_1771	Uncharacterized protein
CDR20291_1772	Uncharacterized protein
CDR20291_1773	Uncharacterized protein
CDR20291_1774	Uncharacterized protein

R20291	Fonction
CDR20291_1775	Uncharacterized protein
CDR20291_1776	Putative conjugal transfer protein (putative single-stranded DNA binding protein)
CDR20291_1777	Uncharacterized protein
CDR20291_1778	Uncharacterized protein
CDR20291_1779	Uncharacterized protein
CDR20291_1780	Uncharacterized protein
CDR20291_1781	Uncharacterized protein
CDR20291_1782	Uncharacterized protein
CDR20291_1783	Uncharacterized protein
CDR20291_1784	Uncharacterized protein
CDR20291_1785	Uncharacterized protein
CDR20291_1786	Uncharacterized protein
CDR20291_1787	Uncharacterized protein
CDR20291_1788	Uncharacterized protein
CDR20291_1809	Site-specific recombinase

Annexe II. Liste des couples d'amorces utilisés pour la RT-PCR en temps réel pour la validation des résultats de la transcriptomique du mutant Δ FliC *in vivo* :

Gènes	Noms attribués aux amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (pb)
CDR0238	fliD-F	AACTGGTTCGTCATCAGACATT	127
	fliD-R	TACACTTGCCACTTTGTTTCCA	
CDR3187	agr2-F	TGGACATACAAATGAAAACAATAAA	147
	agr2-R	ACCTCATAACCTTCTTGCATAAACT	
CDR0598	csfT-F	TATTGGTTGGTGTGACGTTTT	101
	csfT-R	AAAGACTACTTCCGATACCTTTTTC	
CDR2930	treA-F	GGTTTTCGTTTAGATGTAGTCAACC	105
	treA-R	ACCATCAGCGTAATGAGTTCTTC	
CDR0224	rham-F	TATTTTAGCAGGAGGGTCTGGT	118
	rham-R	CAACATAAGAACCACATAGGGTAA	
CDR0783	oppB-F	TGCAAATTAGGAACAATAACCAACT	133
	oppB-R	ATATACTGGACTCTTCTCCATTGA	
CDR2927	pts1-F	AAAATGATGATGTATGTTTTGGTTT	143
	pts1-R	TGTCAGTAGTTGCGTTCTTCTTATT	
CDR2862	pts2-F	TAGAATTAGAAAATGGGATGGAACT	92
	pts2-R	CATACTCACCAATGCCTCAAAA	
CDR3138	pts3-F	TGGGAATTGCAGGGATAGG	145
	pts3-R	AGAGATTGTGCTAATACTGCTACTGG	
CDR0585	tedC-F	ACCATGAGGAGGTCATTCTAATC	128
	tedC-R	AGCTTCTTTTTCGTCGTCTTTC	
CDR0154	hpdA-F	TGCAAATCCAGAAAGTTGGAC	108
	hpdA-R	GCACCATTTTTTACACTTACCATGAC	
CDR0152	hpdB-F	CGCCATTATAGAGTTCTTTTCC	150
	hpdB-R	AGTAACATTTCTCCACCAGACC	
CDR1579	HK-F	TGGAACAGCAAGGGATATAAGTAG	101

	HK-R	GCGTTCTAAGTTCATGGGATAA	
CDR1105	CDR1105-F	TTGATTGTTTATGGGTTTTTGATAGA	147
	CDR1105-R	CCTTATCTGTGCTACATAGTTGTTTTG	
CDR0212	coat-F	GCATCTGCCAATATGTATCTTAATTCT	118
	coat-R	TTAATTCTGTAAGTGCTGTGTGACC	
CDR2491	cdtA-F	GTCCAGTAAATAATCCTAACCCAGA	127
	cdtA-R	AAACCAAATTCTTGAGGACCAG	
CDR2492	cdtB-F	ACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	132
	cdtB-R	CTGCAAACTATCTTCCCCTT	
CDR0584	tcdA-F	GTCGGATTGCAAGTAATTGACAATA	
	tcdA-R	TAACAGTCTGCCAACCTTTTGAGA	
CDR2479	fbpA-F	AGTTCGTCAAGTTTACCTGGTC	120
	fbpA-R	GGTCCTCCAATTCCTCTAGGT	
CDR2678	cwp66-F	TGGGAAACAGCAATAAAAATAAGTC	110
	cwp66-R	TTAGCAAATGGAGTAGCTGATAAAG	
CDR0195	groEL-F	GAAAAGGAATACAAAAAGCAGTAACA	114
	groEL-R	CATCACCAGCAGATATAGAAGCAA	
CDR2676	cwp84-F	TGG GCA ACT GGT GGA AAA TA	151
	cwp84-R	TAG TTG CAC CTT GTG CCT CA	
CDR2864	malY-F	AGGATTTGCTTCCTTTTACAATTTT	96
	malY-R	CCAAAACCTCTATGATTTAACCTTTCC	
CDR0785	oppA-F	GAAAAATGGGACAAAGGTCA	111
	oppA-R	AGCCTTATCATCTGGAACAATC	
CDR0582	tcdB-F	CACTTCTTTTCAGCACCATCA	160
	tcdB-R	CTGGTGTCCATCCTGTTTCC	

Annexe III. Liste des gènes différentiellement exprimés *in vivo* chez le mutant Δ FliC par rapport à la souche sauvage 027 R20291

Classe	Identifiant	Nom	Produit	ΔFliC/027
Cell Factor	CDR20291_2732		Putative amidohydrolase	2.07
Cell Factor	CDR20291_0596		Putative methyltransferase	2.20
Cell Factor	CDR20291_0833		Fragment of putative oxydoreductase (Part 5)	3.24
Cell Factor	CDR20291_1531		Putative serine protease	0.44
Cell Factor	CDR20291_2799		Putative signaling protein	0.39
Cell Factor	CDR20291_1823		putative lipoprotein signal peptidase	2.52
Cell Factor	CDR20291_2755		Putative hydrolase	4.19
Cell Factor	CDR20291_1914		Putative protein with SH3 domain	5.96
Cell Factor	CDR20291_0677		Putative DNA helicase, UvrD/REP type	5.71
Cell Factor	CDR20291_0971		Putative SH3-domain protein	0.44
Cell Factor	CDR20291_3416		Resolvase	2.14
Cell Factor	CDR20291_2087		Putative alpha/beta hydrolase	0.46
Cell Factor	CDR20291_0598	csFT	Extra-Cytoplasmic Function sigma factors, ECF family	5.02
Cell Factor	CDR20291_0314		Putative hydrolase, HAD superfamily, subfamily IB	2.84
Cell Wall	CDR20291_0121		Putative exported protein	1.00
Cell Wall	CDR20291_0122	murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	2.24
Cell Wall	CDR20291_2278		putative peptidoglycan-binding/hydrolysing protein	3.62
Cell Wall	CDR20291_2128		Putative membrane protein	3.59 (S)
Cell Wall	CDR20291_0443		Putative membrane protein	1.00
Cell Wall	CDR20291_0444		Putative membrane protein	2.92
Cell Wall	CDR20291_2552	murE	UDP-N-acetylmuramyl-tripeptide synthetase	0.39
Cell Wall	CDR20291_2092		putative lipoprotein	2.31
Cell Wall	CDR20291_1911	cwp28	Putative cell wall binding protein	3.36
Cell Wall	CDR20291_0440		cell surface protein (putative hemagglutinin/adhesin precursor)	0.11
Cell Wall	CDR20291_2235		Putative membrane protein	2.44
Cell Wall	CDR20291_2057		Putative membrane protein, DUF819 family	0.52 (S)
Cell Wall	CDR20291_0019		Putative membrane protein	2.85
Cell Wall	CDR20291_2678	cwp66	cell surface protein	2.87
Cell Wall	CDR20291_2679		Putative LmbE-like deacetylase	1.00
Cell Wall	CDR20291_2089		Fragment of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (cell wall hydrolase) (N-terminal region)	3.93
Cell Wall	CDR20291_0759		Putative metallo-beta-lactamase superfamily protein	0.47 (S)
Cell Wall	CDR20291_0865		Transcriptional regulator, GntR family	0.27
Cell Wall	CDR20291_0866	nagA	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (GlcNAc 6-P deacetylase)	0.31
Cell Wall	CDR20291_0867	nagB	Glucosamine-6-phosphate deaminase	0.31
Fermentation	CDR20291_2800	adhE	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	0.34
Membrane Transport	CDR20291_2609		Putative transporter	2.48
Membrane Transport	CDR20291_2862		PTS system, glucose-like IIA component	0.07
Membrane Transport	CDR20291_2863		Putative phosphosugar isomerase	0.06
Membrane Transport	CDR20291_2864	malY	Bifunctional protein: cystathionine beta-lyase / repressor	0.05
Membrane Transport	CDR20291_2865		PTS system, glucose-like IIBC component	0.04
Membrane Transport	CDR20291_2866		Transcription antiterminator, PTS operon regulator	0.37
Membrane Transport	CDR20291_2401		Putative glycoside hydrolase, family 4	0.23

Membrane Transport	CDR20291_2402		PTS system, glucose-like IIBC component	0.26
Membrane Transport	CDR20291_2403		Transcription antiterminator, PTS operon regulator	0.34
Membrane Transport	CDR20291_2404		PTS system, glucose-like IIA component	0.23
Membrane Transport	CDR20291_0802		ABC-type transport system, sugar-family extracellular solute-binding protein	0.15
Membrane Transport	CDR20291_0803		ABC-type transport system, sugar-family ATP-binding protein	0.07
Membrane Transport	CDR20291_0804		ABC-type transport system, sugar-family permease	1.00
Membrane Transport	CDR20291_0805		ABC-type transport system, sugar-family extracellular solute-binding protein	1.00
Membrane Transport	CDR20291_0806		ABC-type transport system, sugar-family ATP-binding protein	1.00
Membrane Transport	CDR20291_0807		ABC-type transport system, sugar-family permease	1.00
Membrane Transport	CDR20291_0359	bglF	PTS system, beta-glucoside-specific IIABC component	0.37
Membrane Transport	CDR20291_0360	bglA	6-phospho-beta-glucosidase	0.38
Membrane Transport	CDR20291_0361	bglG	Transcription antiterminator, PTS operon regulator	1.00
Membrane Transport	CDR20291_2927		Putative cellobiose-phosphate degrading protein	51.25
Membrane Transport	CDR20291_2928		PTS system, glucose-like IIBC component	33.82
Membrane Transport	CDR20291_2554	ptsG-A	PTS system, glucose-specific IIA component	0.26
Membrane Transport	CDR20291_2555	ptsG-BC	PTS system, glucose-specific IIBC component	0.36
Membrane Transport	CDR20291_2556		Transcription antiterminator, licT family	1.00
Membrane Transport	CDR20291_1824		ABC-type transport system, permease	2.73
Membrane Transport	CDR20291_1825			2.38
Membrane Transport	CDR20291_3136		Putative phosphosugar isomerase	10.06
Membrane Transport	CDR20291_3137		PTS system, mannose/fructose/sorbose IID component	4.44
Membrane Transport	CDR20291_3138		PTS system, mannose/fructose/sorbose IIC component	11.76
Membrane Transport	CDR20291_3139		PTS system, mannose/fructose/sorbose IIA component	10.83
Membrane Transport	CDR20291_3140		PTS system, mannose/fructose/sorbose IIB component	7.75
Membrane Transport	CDR20291_3141		Transcription antiterminator, PTS operon regulator	1.00
Membrane Transport	CDR20291_2983		Putative abc-type transport system periplasmic component-like protein precursor	2.80
Membrane Transport	CDR20291_1366	feoB	Ferrous iron transport protein B	1.00
Membrane Transport	CDR20291_1367	feoA	Ferrous iron transport protein	2.59
Membrane Transport	CDR20291_0672		Putative MotA/ToIQ/ExbB proton channel	1.00
Membrane Transport	CDR20291_0673		Putative OmpA/MotB proton channel	0.40
Membrane Transport	CDR20291_0146		Putative transporter	2.21
Membrane Transport	CDR20291_2954	bglA	6-phospho-beta-glucosidase	0.34
Membrane Transport	CDR20291_2955	bglF	PTS system, beta-glucoside-specific IIABC component	0.36
Membrane Transport	CDR20291_2956	bglG	Transcription antiterminator, PTS operon regulator	0.22
Membrane Transport	CDR20291_2981		spermidine/putrescine abc transporter atp-binding subunit	3.39
Membrane Transport	CDR20291_2077		Fragment of putative sodium:dicarboxylate symporter (Part 1)	2.63
Membrane Transport	CDR20291_2049		Putative transporter	2.14
Membrane Transport	CDR20291_1404		Putative amino acid permease	2.66
Membrane Transport	CDR20291_2247		Conserved hypothetical protein	1.00
Membrane Transport	CDR20291_2248		ABC-type transport system, nitrate/sulfonate/taurine ATP-binding protein	0.45
Membrane Transport	CDR20291_2249		Fragment of ABC-type transport system, permease (Part 1)	0.48
Membrane Transport	CDR20291_2250		Conserved hypothetical protein	0.31
Membrane Transport	CDR20291_2251		Conserved hypothetical protein	0.45
Membrane Transport	CDR20291_2252		ABC-type transport system, nitrate/sulfonate/taurine	0.46

			extracellular solute-binding protein	
Membrane Transport	CDR20291_2253		Conserved hypothetical protein	0.29
Membrane Transport	CDR20291_2254		ABC-type transport system, multidrug-family permease	0.45
Membrane Transport	CDR20291_2255		Conserved hypothetical protein	1.00
Membrane Transport	CDR20291_2256		Conserved hypothetical protein	1.00
Membrane Transport	CDR20291_2014		Xanthine/uracil/thiamine/ascorbate permease family protein	0.35
Membrane Transport	CDR20291_2533		ABC-type transport system, sugar-family extracellular solute-binding protein	3.06
Membrane Transport	CDR20291_0783	oppB	ABC-type transport system, oligopeptide-family permease	0.07
Membrane Transport	CDR20291_0784	oppC	ABC-type transport system, oligopeptide-family permease	0.08
Membrane Transport	CDR20291_0785	oppA	ABC-type transport system, oligopeptide-family extracellular solute-binding protein	0.06
Membrane Transport	CDR20291_0786	oppD	ABC-type transport system, ATP-binding component	0.10
Membrane Transport	CDR20291_0787	oppF	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	0.08
Membrane Transport	CDR20291_2428		Sodium:glutamate/aspartate symporter family	2.42
Membrane Transport	CDR20291_0832		Putative cation efflux protein	4.24
Membrane Transport	CDR20291_2924	mngB	Alpha-mannosidase	2.27
Membrane Transport	CDR20291_2925	mngA	PTS system, 2-O-a-mannosyl-D-glycerate-specific IIBC component	1.00
Membrane Transport	CDR20291_2926		Transcriptional regulator, RpiR family	4.10
Membrane Transport	CDR20291_0551		abc transporter, atp-binding/permease protein	3.73
Membrane Transport	CDR20291_1176		Transcriptional regulator, MarR family	1.00
Membrane Transport	CDR20291_1177		PTS system, glucose-like IIBC component	0.40
Membrane Transport	CDR20291_1178		Transcriptional regulator, RpiR family	1.00
Membrane Transport	CDR20291_1179		Putative 6-phospho-beta-glucosidase	0.49
Membrane Transport	CDR20291_1354		Putative drug/sodium antiporter, MATE family	4.72
Membrane Transport	CDR20291_0159		ABC-type transport system, multidrug-family ATP-binding protein	0.36
Membrane Transport	CDR20291_0160		Putative radical SAM-family protein	0.45
Membrane Transport	CDR20291_0161		Conserved hypothetical protein	1.00
Membrane Transport	CDR20291_0162		Conserved hypothetical protein	0.49
Membrane Transport	CDR20291_2078		ABC-type transport system, cystine/aminoacid-family ATP-binding protein	0.45
Membrane Transport	CDR20291_2079		Putative peptidase, M20D family	1.00
Membrane Transport	CDR20291_2080		ABC-type transport system, cystine/aminoacid-family extracellular solute-binding protein	0.32
Membrane Transport	CDR20291_2081		ABC-type transport system, cystine/aminoacid-family permease	0.38
Membrane Transport	CDR20291_2082		ABC-type transport system, cystine/aminoacid-family permease	0.25
Membrane Transport	CDR20291_2083		ABC-type transport system, cystine/aminoacid-family extracellular solute-binding protein	0.26
Membrane Transport	CDR20291_3476		Transcriptional regulator, MerR family	2.13
Membrane Transport	CDR20291_3477		Na(+)/H(+) antiporter	1.00
Membrane Transport	CDR20291_0001		Putative small-molecule-binding protein	2.69
Membrane Transport	CDR20291_0002		Putative mechanosensitive ion channel protein	1.00
Metabolism Amino Acid	CDR20291_0306	argE	Acetylornithine deacetylase ArgE	2.54
Metabolism Amino Acid	CDR20291_0307		Conserved hypothetical protein, DUF1355 family	3.34
Metabolism Amino Acid	CDR20291_3083	dapA2	Dihydrodipicolinate synthase 2	2.91
Metabolism Amino	CDR20291_2144	asnC	Asparaginyl-tRNA synthetase (Asparagine--tRNA ligase)	2.11

Acid			(AsnRS)	
Metabolism Carbon	CDR20291_2839		Putative N-terminus region of carbohydrate hydrolase, SAF domain	0.47
Metabolism Carbon	CDR20291_1181		Putative galactose-1-phosphate uridylyltransferase	2.24
Metabolism Carbon	CDR20291_1279		Putative delta-lactam-biosynthetic de-N-acteylase	2.99
Metabolism Carbon	CDR20291_0224		glucose-1-phosphate thymidyltransferase	4.82
Metabolism Carbon	CDR20291_0225		dt dp-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	3.09
Metabolism Carbon	CDR20291_0226		dt dp-glucose 4,6-dehydratase	5.91
Metabolism Carbon	CDR20291_2260		Putative CstA-like carbon starvation protein	0.31
Metabolism Carbon	CDR20291_2274		Alpha-hydroxy acid dehydrogenase, FMN-dependent	0.45
Metabolism Carbon	CDR20291_2017		Putative transaldolaseC-like	0.26
Metabolism Carbon	CDR20291_2717		Putative aldolase	0.18
Metabolism Carbon	CDR20291_2718		Transcriptional regulator, MarR family	1.00
Metabolism Carbon	CDR20291_2930	treA	Trehalose-6-phosphate hydrolase	24.38
Metabolism Carbon	CDR20291_2944		Transaldolase	1.00
Metabolism Carbon	CDR20291_2945		Transcription antiterminator, PTS operon regulator	2.47
Metabolism Carbon	CDR20291_0243		glycosyl transferase, group 2 family	2.19
Metabolism Cofactor	CDR20291_0780		Putative NifU-like protein	0.38
Metabolism Cofactor	CDR20291_1571		Putative NADPH-dependent FMN reductase	0.35
Metabolism Cofactor	CDR20291_1361	panC	Pantothenate synthetase	0.33
Metabolism Cofactor	CDR20291_1362	panB	Ketopantoate hydroxymethyltransferase	0.31
Metabolism Cofactor	CDR20291_1363		Conserved hypothetical protein	0.39
Metabolism Cofactor	CDR20291_1028		Putative acyl-CoA N-acyltransferase	0.52
Metabolism Cofactor	CDR20291_1874		putative Acyl-CoA N-acyltransferase	3.52
Metabolism Nucleic Acid	CDR20291_0633		Putative diguanylate kinase signaling protein	2.07
Mobile Element	CDR20291_3475	int	Integrase Tn916-like, CTn1-Orf1	0.06
Mobile Element	CDR20291_1740		Fragment of putative methyltransferase (N-terminal region)	4.45
Mobile Element	CDR20291_1741		Putative membrane protein Tn1549-like, CTn5-Orf1	5.26
Mobile Element	CDR20291_3281		transposon Tn21 resolvase	3.65
Mobile Element	CDR20291_1817		Conserved hypothetical protein	3.19
Mobile Element	CDR20291_1818		Putative phage-related cell wall hydrolase (endolysin)	2.09
Mobile Element	CDR20291_1805	vexP3	ABC-type transport system, permease Tn1549-like, CTn5-Orf35	3.86
Mobile Element	CDR20291_1080		Putative phage protein	2.84
Mobile Element	CDR20291_1418		putative phage-related protein	2.12
Mobility	CDR20291_0227		Putative lytic transglycosylase	2.03
Mobility	CDR20291_0228		Conserved hypothetical protein	1.00
Mobility	CDR20291_0229	fliN	Flagellar motor switch protein FliN	1.00
Mobility	CDR20291_0230	flgM	Negative regulator of flagellin synthesis (Anti-sigma-d factor)	0.20
Mobility	CDR20291_0231		Putative flagellar biosynthesis protein	3.30
Mobility	CDR20291_0232	flgK	Flagellar hook-associated protein FlgK (or HAP1)	0.40
Mobility	CDR20291_0233	flgL	Flagellar hook-associated protein FlgL (or HAP3)	1.00
Mobility	CDR20291_0234	fliW	Flagellar assembly factor FliW	2.03
Mobility	CDR20291_0235	csrA	Carbon storage regulator homolog CsrA	4.36
Mobility	CDR20291_0236	fliS1	Flagellar protein FliS1	3.99
Mobility	CDR20291_0237	fliS2	Flagellar protein FliS2	2.17
Mobility	CDR20291_0238	fliD	Flagellar hook-associated protein 2 FliD (or HAP2)	5.05
Mobility	CDR20291_0239		Conserved hypothetical protein	4.99

Mobility	CDR20291_0240	fliC	Flagellin C	0.11
Mobility	CDR20291_0241		Glycosyltransferase	1.00
Mobility	CDR20291_0248	flgB	Flagellar basal-body rod protein FlgB	0.34
Mobility	CDR20291_0249	flgC	Flagellar basal-body rod protein FlgC	0.31
Mobility	CDR20291_0250	fliE	Flagellar hook-basal body complex protein FliE	0.25
Mobility	CDR20291_0251	fliF	Flagellar M-ring protein FliF	0.28
Mobility	CDR20291_0252	fliG	Flagellar motor switch protein FliG	0.18
Mobility	CDR20291_0253	fliH	Flagellar assembly protein FliH	0.35
Mobility	CDR20291_0254	fliI	ATP synthase subunit beta FliI	0.39
Mobility	CDR20291_0255	fliJ	Flagellar protein FliJ	0.41
Mobility	CDR20291_0256	fliK	Flagellar hook-length control protein FliK	0.30
Mobility	CDR20291_0257	flgD	Basal-body rod modification protein FlgD	0.29
Mobility	CDR20291_0258	flgE	Flagellar hook protein FlgE (Distal rod protein)	0.32
Mobility	CDR20291_0259	FliD	Flagellar protein FliD	0.24
Mobility	CDR20291_0260	motA	Flagellar motor rotation protein MotA	0.19
Mobility	CDR20291_0261	motB	Flagellar motor rotation protein MotB (Chemotaxis protein MotB)	0.36
Mobility	CDR20291_0262	fliL	Flagellar basal body-associated protein FliL	0.51
Mobility	CDR20291_0263	fliZ	Flagellar protein FliZ	1.00
Mobility	CDR20291_0264	fliP	Flagellar biosynthesis protein FliP	0.40
Mobility	CDR20291_0265	fliQ	Flagellar biosynthetic protein FliQ	1.00
Mobility	CDR20291_0266	flhB	Bifunctional flagellar biosynthesis protein FliR/FlhB	1.00
Mobility	CDR20291_0267	flhA	Flagellar biosynthesis protein FlhA	0.41
Mobility	CDR20291_0268	flhF	Flagellar biosynthesis regulator FlhF (Flagella-associated GTP-binding protein)	0.43
Mobility	CDR20291_0269	flhG	Flagellar number regulator FlhG	0.47
Mobility	CDR20291_0270	fliA	RNA polymerase sigma-28factor for flagellar operon	0.42
Mobility	CDR20291_0271		Putative flagellar protein	0.31
Mobility	CDR20291_0272	flgG1	Flagellar hook-basal body complex protein FlgG1	1.00
Mobility	CDR20291_0273	flgG	Flagellar basal body rod protein FlgG	1.00
Mobility	CDR20291_0274	fliM	Flagellar motor switch protein FliM	0.45
Mobility	CDR20291_0275	fliN	Flagellar motor switch phosphatase FliN	1.00
Mobility	CDR20291_0276		Conserved hypothetical protein	0.47
Regulations	CDR20291_2399		Conserved hypothetical protein	0.36
Regulations	CDR20291_2400		Transcriptional regulator, AraC family	0.33
Regulations	CDR20291_1127	fur	Transcriptional regulator, Fur family	2.21
Regulations	CDR20291_0938		Transcriptional regulator, LysR family	2.38
Regulations	CDR20291_2760		two-component system, sensor histidine kinase	2.02
Regulations	CDR20291_1105		Transcriptional regulator, CarD family	3.49
Regulations	CDR20291_0781		Putative membrane protein	0.34
Regulations	CDR20291_0782		Transcriptional regulator, MarR family	1.00
Regulations	CDR20291_0591		Two-component response regulator	1.00
Regulations	CDR20291_0592		Two-component sensor histidine kinase	0.21
Regulations	CDR20291_3187		accessory gene regulator	4.89
Regulations	CDR20291_3188		sensor histidine kinase virs	3.13
Regulations	CDR20291_3189		dna-binding response regulator, lyttr family	3.30
Regulations	CDR20291_1936		Transcriptional regulator, GntR family	1.90
Regulations	CDR20291_2929	treR	Transcriptional regulator, GntR family	3.72
Regulations	CDR20291_3021		Putative phosphatidylethanolamine-binding regulatory protein	2.38

Regulations	CDR20291_1952		Putative membrane protein	2.56
Regulations	CDR20291_1953		Transcriptional regulator, HTH-type	1.00
Regulations	CDR20291_3004		Transcriptional regulator, Phage-type	2.12
Regulations	CDR20291_2121	SinR	Transcriptional regulator, HTH-type	1.00
Regulations	CDR20291_2122		Transcriptional regulator, HTH-type	2.66
Regulations	CDR20291_3469		transcriptional regulator, tetr family	3.38
Regulations	CDR20291_0384		Transcriptional regulator, sigma-54-dependent	2.88
Regulations	CDR20291_2553		Transcriptional regulator, AraC family	0.28
Regulations	CDR20291_2964		transcriptional regulator, padr-like family	2.34
Regulations	CDR20291_0395		Transcriptional regulator, AraC family	0.38
Regulations	CDR20291_3054		Transcriptional regulator, AraC family	0.34
Respiration Anaerobic	CDR20291_1308		Putative FMN-binding protein	4.29
Respiration Anaerobic	CDR20291_3045		Putative NADPH-dependent FMN reductase	0.29
Respiration Anaerobic	CDR20291_3046		Transcriptional regulator, MerR family	0.29
Respiration Anaerobic	CDR20291_3047		Putative oxidoreductase	0.35
Respiration Anaerobic	CDR20291_0824		Putative iron-dependent hydrogenase	0.40
Respiration Anaerobic	CDR20291_2570	pfo	Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase	0.50
Secretion	CDR20291_3278		Putative exported protein precursor	4.25
Secretion	CDR20291_3350		Putative pilin protein	3.84
Sporulation	CDR20291_0212		Putative spore coat protein	6.88
Sporulation	CDR20291_0213		Conserved hypothetical protein	8.22
Sporulation	CDR20291_0337			3.22
Sporulation	CDR20291_3090	bclA2	Putative exosporium glycoprotein	3.32
Sporulation	CDR20291_3193	bclA3	Exosporium glycoprotein BclA3	2.82
Sporulation	CDR20291_2289		Conserved hypothetical protein	2.93
Sporulation	CDR20291_2290	cotJB2	Spore coat peptide assembly protein CotJB 2	1.00
Sporulation	CDR20291_2291	cotJC2	Spore coat peptide assembly protein CotJC 2	4.18
Sporulation	CDR20291_2802	spoVFB	Dipicolinate synthase subunit B	3.40
Sporulation	CDR20291_2803	dpaA	Dipicolinate synthase subunit A	1.00
Sporulation	CDR20291_0714	spoIVB	Stage IV sporulation protein SpoIVB, S55 peptidase family	4.08
Sporulation	CDR20291_1476		Two-component sensor histidine kinase, sporulation-associated spo0A	2.46
Sporulation	CDR20291_3406		Sporulation-specific protease	2.98
Stress	CDR20291_1759		addiction module toxin, rele/stbe family	3.40
Stress	CDR20291_1760		addiction module antitoxin, relb/dinj family	2.90
Stress	CDR20291_0567		ABC-type transport system, lantibiotic/multidrug-family ATP-binding protein	0.30
Stress	CDR20291_0568		ABC-type transport system, lantibiotic/multidrug-family permease	0.36
Stress	CDR20291_0489		putative ATP-dependent protease	2.41
Stress	CDR20291_2909		type i restriction enzyme r subunit	2.51
Stress	CDR20291_2994		crispr-associated helicase cas3	1.93
Stress	CDR20291_2995		crispr-associated autoregulator, devr family	2.12
Stress	CDR20291_2996		hypothetical protein	2.24
Stress	CDR20291_2997		crispr-associated protein cas6	1.00
Stress	CDR20291_2998		crispr-associated protein cas5 family	2.45
Stress	CDR20291_3461		Chloramphenicol o-acetyltransferase	3.39
Stress	CDR20291_2125	sat	Streptogramin A acetyltransferase (Virginiamycin acetyltransferase D) (Vat(D))	2.10
Translation	CDR20291_1335		Putative ribosome recycling factor	4.70

UNKNOWN	CDR20291_2705		Conserved hypothetical protein	3.45
UNKNOWN	CDR20291_1478		Conserved hypothetical protein	2.27
UNKNOWN	CDR20291_1747		hypothetical protein	2.02
UNKNOWN	CDR20291_1429		hypothetical protein	2.97
UNKNOWN	CDR20291_1430		hypothetical protein	3.08
UNKNOWN	CDR20291_3094		Conserved hypothetical protein	2.43
UNKNOWN	CDR20291_0738		Conserved hypothetical protein	2.71
UNKNOWN	CDR20291_2878		Conserved hypothetical protein	0.34
UNKNOWN	CDR20291_1447		hypothetical protein	3.67
UNKNOWN	CDR20291_1448		hypothetical protein	2.71
UNKNOWN	CDR20291_0511		Conserved hypothetical protein	3.47
UNKNOWN	CDR20291_0512		Conserved hypothetical protein	3.76
UNKNOWN	CDR20291_2908		hypothetical protein	2.75
UNKNOWN	CDR20291_1443		hypothetical protein	2.60
UNKNOWN	CDR20291_0920		Conserved hypothetical protein	7.57
UNKNOWN	CDR20291_1954		Conserved hypothetical protein	3.22
UNKNOWN	CDR20291_0197		Fragment of conserved hypothetical protein, DUF111 family (part 2)	5.53
UNKNOWN	CDR20291_0661		Conserved hypothetical protein	0.34
UNKNOWN	CDR20291_0662		Conserved hypothetical protein	0.34
UNKNOWN	CDR20291_0663		Conserved hypothetical protein	0.33
UNKNOWN	CDR20291_3482		Conserved hypothetical protein	2.77
UNKNOWN	CDR20291_2961		hypothetical protein	2.70
UNKNOWN	CDR20291_1462		hypothetical protein	3.26
UNKNOWN	CDR20291_1258		Conserved hypothetical protein	3.96
UNKNOWN	CDR20291_1688		Conserved hypothetical protein	2.43
UNKNOWN	CDR20291_2028		Conserved hypothetical protein	3.77
UNKNOWN	CDR20291_2990		hypothetical protein	2.89
UNKNOWN	CDR20291_1439		hypothetical protein	0.33
UNKNOWN	CDR20291_1657		Conserved hypothetical protein	0.28
UNKNOWN	CDR20291_1774		hypothetical protein	2.97
UNKNOWN	CDR20291_1558		Conserved hypothetical protein, DUF 1255 family	2.42
UNKNOWN	CDR20291_2155		Conserved hypothetical protein	4.43
UNKNOWN	CDR20291_0299		Conserved hypothetical protein	2.49
UNKNOWN	CDR20291_1962		Conserved hypothetical protein	4.43
UNKNOWN	CDR20291_3451		Conserved hypothetical protein	4.33
UNKNOWN	CDR20291_0244		hypothetical protein	2.77
UNKNOWN	CDR20291_1929		Conserved hypothetical protein	8.68
UNKNOWN	CDR20291_0969		Conserved hypothetical protein	4.28
UNKNOWN	CDR20291_1312		Conserved hypothetical protein	3.82
UNKNOWN	CDR20291_3285		putative uncharacterized protein precursor	5.45
UNKNOWN	CDR20291_2843		Putative L,D-transpeptidases	3.49
UNKNOWN	CDR20291_3455		hypothetical protein	2.91
UNKNOWN	CDR20291_3456		hypothetical protein	2.95
UNKNOWN	CDR20291_3457		hypothetical protein	3.39
UNKNOWN	CDR20291_1511		Conserved hypothetical protein	2.88
UNKNOWN	CDR20291_1810		Conserved hypothetical protein	2.41
UNKNOWN	CDR20291_0045		hypothetical protein	2.77
UNKNOWN	CDR20291_3286		hypothetical protein	3.09

UNKNOWN	CDR20291_3417		Conserved hypothetical protein	2.07
UNKNOWN	CDR20291_0474		Conserved hypothetical protein	2.42
UNKNOWN	CDR20291_2300		Conserved hypothetical protein	4.23
Virulence Factors	CDR20291_0581	tcdR	Alternative RNA polymerase sigma factors	1.00
Virulence Factors	CDR20291_0582	tcdB	Toxin B	1.00
Virulence Factors	CDR20291_0583	tcdE	Holin-like pore-forming protein	1.00
Virulence Factors	CDR20291_0584	tcdA	Toxin A	1.00
Virulence Factors	CDR20291_0585	tcdC	Negative regulator of toxin gene expression	0.48
Virulence Factors	CDR20291_0152	hpdB	4-hydroxyphenylacetate decarboxylase, catalytic subunit	1.00
Virulence Factors	CDR20291_0153	hpdC	4-hydroxyphenylacetate decarboxylase, regulatory subunit	1.00
Virulence Factors	CDR20291_0154	hpdA	4-hydroxyphenylacetate decarboxylase, activating subunit	3.11
Virulence Factors	CDR20291_2490	cdtR	Binary toxin regulatory gene, LytTR family	1.00
Virulence Factors	CDR20291_2491	cdtA	Fragment of ADP-ribosyltransferase CdtAB (Part 2)	1.00
Virulence Factors	CDR20291_2492	cdtB	Fragment of ADP-ribosyltransferase CdtAB (Part 7)	2.36

Annexe IV. Liste des couples d'amorces utilisés pour la RT-PCR en temps réel pour la validation des résultats de transcriptomique de la cinétique de colonisation *in vivo* par la souche 027 de *C. difficile* :

Gènes	Amorces	Sequences
CDR2491	cdtA-F	GTCCAGTAAATAATCCTAACCCAGA
	cdtA-R	AAACCAAATTCTTGAGGACCAG
CDR2492	cdtB-F	ACCCAAAGTTGATGTCTGATTG
	cdtB-R	CTGCAAACTATCTTCCCCTT
CDR0583	tcdE-F	AATATGTGCTTATGTGGATTACCAG
	tcdE-R	TCCTTAGCATTCAATTCATCTGTC
CDR1740	CTn5-F	GCGTTATTGTCCAACTTGATG
	CTn5-R	GTTGCTTTGCTCTCTGCACTT
CDR0043	thyA-F	AGGTAGTTAGAGCAAAATGGGATG
	thyA-R	GCTGCTTTAAGTTTGTGGTC
CDR2214	gatC-F	ATGTAGGTATATCAATGGGTGCAGT
	gatC-R	GTTCTCTGTCTCCATATTTTGCTTG
CDR2402	pts2402-F	AAGCAGCGTTAATAGGATTTATGAG
	pts2402-R	CCTAAAATAGTAGCTTGTCCAGTCC
CDR0584	tcdA-F	GTCGGATTGCAAGTAATTGACAATA
	tcdA-R	TAACAGTCTGCCAACCTTTTGAGA
CDR1052	Spo0A-F	AGTTGAGCCAAAACCTAGACCA
	Spo0A-R	TCCTTTTATATGAGCTGGTACTCCT
CDR0520	CotJB1-F	AATTTCAGAATATCAATTTGCCTGT
	CotJB1-R	CAGCTTGTGTAAATTTATCGCAGTA
CDR3090	bclA2-F	TATCTTTCGGTATACGTGCCATACT
	bclA2-R	TTGCAATAAAGTTATTTTGGGCTAC

Communications dans des congrès internationaux

- P. Spigaglia, A. Barketi-Klai, A. Collignon, P. Mastrantonio, F. Barbanti, M. Rupnik, S. Janezic, I. Kansau, *Clostridium difficile S layer variability and role in adherence to epithelial cells and intestinal colonization*, poster at 4th International Clostridium difficile Symposium (ICDS), Bled-Slovenia, September 2012.
- A. Barketi-Klai, M. Monot, S. Hoys, S. Lambert, B. Dupuy, I. Kansau and A. Collignon, *Analysis of the genome-wide temporal expression of a Clostridium difficile 027 hypervirulent strain in monoxenic mice*, Communication Orale à la 7th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia – ClostPath, Iowa-USA, Octobre 2011.
- A. Barketi-Klai, M. Monot, S. Hoys, S. Lambert, B. Dupuy, A. Collignon, and I. Kansau, *Analysis of the genome-wide expression of a Clostridium difficile fliC mutant in monoxenic mice*, Poster à la 7th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia – ClostPath, Iowa-USA, Octobre 2011.
- A. Barketi-Klai, S. Hoys, S. Lambert-Bordes, A. Collignon, and I. Kansau, *Characterization of fibronectin binding protein A (FBPA) mutant from Clostridium difficile*, Poster aux 3rd ICDS « International Clostridium difficile Symposium », Bled-Slovenie, Septembre 2010.
- S. Baban, S. kuehne, A. Barketi, Kim Hardie, I. kansau, A. Collignon, N. Minton, *Role of flagella in aspects of Clostridium difficile virulence*, Poster aux 3rd ICDS « International Clostridium difficile Symposium », Bled-Slovenie, Septembre 2010.
- A. Barketi-Klai, I. Kansau, S. Hoys, S. Lambert and A. Collignon, *Role of fibronectin binding protein A in Clostridium difficile intestinal colonization*, Poster à la 6th ClostPath International Conference « Clostridia: The Impact of Genomics on Disease Control », Rome-Italie, Octobre 2009.
- S. Baban, S. kuehne, A. Barketi, Kim Hardie, I. kansau, A. Collignon, N. Minton, *Role of flagella in aspects of Clostridium difficile virulence*, Poster à la 6th ClostPath International Conference « Clostridia: The Impact of Genomics on Disease Control », Rome-Italie, Octobre 2009.

Publications en préparation

- Barketi-Klai, M. Monot, S. Hoys, S. Lambert, B. Dupuy, A. Collignon and I. Kansau. *Analysis of the genome-wide temporal expression of a Clostridium difficile 027 hypervirulent strain in monoxenic mice*. En préparation.
- A. Barketi-Klai, M. Monot, S. Hoys, S. Lambert, B. Dupuy, A. Collignon, and I. Kansau, *Analysis of the genome-wide expression of a Clostridium difficile fliC mutant in monoxenic mice*. En préparation.