

# Développement d'une stratégie vaccinale par voie muqueuse ciblant les protéines de surface de *Clostridium difficile*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique :  
du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat: Microbiologie et Thérapeutiques anti-infectieuses

Thèse présentée et soutenue à Chatenay Malabry, le 13 Novembre 2017, par

**Jean-François Bruxelles**

## Composition du Jury :

Frédéric Barbut PU-PH, Université Paris-Descartes (EA 4065)	Président
Anne Judith Waligora-Dupriet MCU, Université Paris-Descartes (EA 4065)	Rapporteur
Didier Betbeder PU, Université Lille 2 (LIRIC-UMR 995)	Rapporteur
Anne Collignon PU, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay (UBaPs- EA4043)	Directeur de thèse
Séverine Péchiné MCU, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay (UBaPs- EA4043)	Co-Directeur de thèse

# Remerciements

---

Je tiens à remercier vivement, Madame Anne-Judith Waligora-Dupriet et Monsieur Didier Betbeder rapporteur de cette thèse, pour avoir accepté d'évaluer ce travail. J'associe à ces remerciements Monsieur Frédéric Barbut pour avoir accepté de l'examiner.

Ce travail conclut quatre années de travail réalisées au sein de l'unité EA4043, Unité Bactérie Pathogène et Santé (UBaPS) à la faculté de pharmacie de l'Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud à Chatenay Malabry. Je remercie du fond du cœur Madame Anne Collignon, Madame Claire Janoir et Madame Séverine Péchiné pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et pour avoir rendu cette expérience possible.

Anne, je te remercie sincèrement pour ton encadrement et pour l'ensemble de tes conseils qui resteront gravés à jamais dans mon esprit. Je te remercie pour ton soutien, ta rigueur et ton exigence qui m'ont grandement stimulé tout au long de cette thèse.

Séverine, je ne te remercierais jamais assez pour m'avoir autant soutenu et cru en moi depuis le Master 2 et pendant ces quatre années. Ta confiance, ton optimisme et ta patience ont été de puissants moteurs pour moi et ce projet, « chi va piano, va sano e va lontano ». Je te remercie pour ta disponibilité, ton encadrement quotidien, et d'avoir fait de moi un membre de la « vaccine team ». Un grand merci pour cette expérience scientifique et humaine inoubliable !

Je voudrais aussi remercier et applaudir l'ensemble de l'équipe UBaPS pour la bonne humeur journalière indispensable à chacun. Je remercie particulièrement, Monsieur Thomas Candela, Madame Cécile Denève-Larrazet, Monsieur Jean-Christophe Marvaud, Monsieur Alban Le Monnier et Monsieur Assaf Mizrahi pour vos précieuses aides dans les divers projets de ce travail de thèse, un grand merci pour votre expérience et expertise.

Thomas, Cécile, de collègues vous êtes rapidement devenus des amis de confiance, un grand merci pour tous ces moments mémorables.

Très chère consœur et amie Héloïse Coulon, partager mon quotidien avec toi a été un véritable plaisir. Tu as toujours été à l'écoute et de très bons conseils dans les bons comme les mauvais moments. Nos échanges divers et variés, nos soirées sushis entre étudiants ont été de véritables bouffées d'air frais salvatrices, merci pour tout !

Une mention spéciale pour Madame Sandra Hoys et Madame Myriam Gaudrillet, je vous remercie infiniment pour votre aide inestimable et votre professionnalisme. Je n'oublierais jamais votre bonne humeur et tous les petits bons moments agrémentant nos journées.

Je remercie également l'ensemble de nos collaborateurs extérieurs pour avoir contribué à mener à bien nos projets, Monsieur Nicolas Tsapis, Monsieur Elias Fattal, Monsieur Stephen Mitchell et Monsieur Adriano Henriques.

Un grand merci à tous pour ces quatre années mémorables riches d'expériences professionnelles, scientifiques et humaines !

*Je dédie cette thèse à mes chers parents,*

## TABLE DES MATIERES

<b>Introduction</b>	3
<b>Données bibliographiques</b>	7
1. Généralités sur les infections à <i>Clostridium difficile</i>	7
1.1. Définition et caractéristiques des infections à <i>C. difficile</i>	8
1.2. Facteurs de risque	10
1.3. Epidémiologie	13
1.4. Traitements et prises en charge des infections à <i>C. difficile</i>	19
2. Facteurs de pathogénicité de <i>C. difficile</i> et physiopathologie	20
2.1. La spore	21
2.2. Les composants de surface de la forme végétative	23
2.3. Les toxines	30
3. <i>C. difficile</i> et immunité muqueuse	33
3.1. <i>C. difficile</i> et réponse immunitaire innée	33
3.2. <i>C. difficile</i> et réponse immunitaire adaptative	40
4. Stratégies immuno-thérapeutiques contre les infections à <i>C. difficile</i> : revue 1	43
<b>Travaux personnels</b>	86
<b>Objectifs scientifiques</b>	87
1. Le candidat vaccin SlpA	90
1.1. Article 1: Evaluation of the Surface Layer Protein (SlpA) precursor of <i>Clostridium difficile</i> as a possible vaccine candidate for <i>Clostridium difficile</i> infection	91
1.2. Article 2: Immunogenic properties of the surface layer precursor of <i>Clostridium difficile</i> and vaccination assays in animal models	102
2. Le candidat vaccin FliC	112
2.1. Article 3: <i>Clostridium difficile</i> flagellin FliC: evaluation as adjuvant and use in a mucosal vaccine against <i>Clostridium difficile</i>	113

2.2. Article 4: Efficient protection against <i>Clostridium difficile</i> by oral vaccination using flagellin FliC-loaded pectin beads in a hamster model	138
3. Recherche de nouveaux candidats vaccins	148
3.1. Rôle de CdeM dans la virulence de <i>C. difficile</i>	149
3.2. Rôle de la lipoprotéine CD0873 dans la colonisation intestinale par <i>C. difficile</i>	152
3.3. Essai vaccinal par une combinaison d'antigènes	158
4. Discussion	163
<b>Conclusion Perspectives</b>	174
<b>Références bibliographiques</b>	177
<b>Annexe</b>	198

## **Abréviations**

CPM: Colite Pseudomembraneuse

CWP : Cell Wall Protein

DO: Densité Optique

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISPOT: Enzyme-linked Immunospot

FLA-ST: Flagelline de *Salmonella* serovar Typhimurium

GALT: Gut Associated Lymphoid Tissu

ICD: Infection à *Clostridium difficile*

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IgAs: Immunoglobuline A sécrétoire

IL: Interleukine

IP: Intra-péritonéal

IR: Intra-rectal

OVA: Ovalbumine

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

PCR: Polymerase Chain Reaction

PRR : Pathogen Recognition Receptor

SLP: Surface Layer Protein

TC : Toxine Cholérique

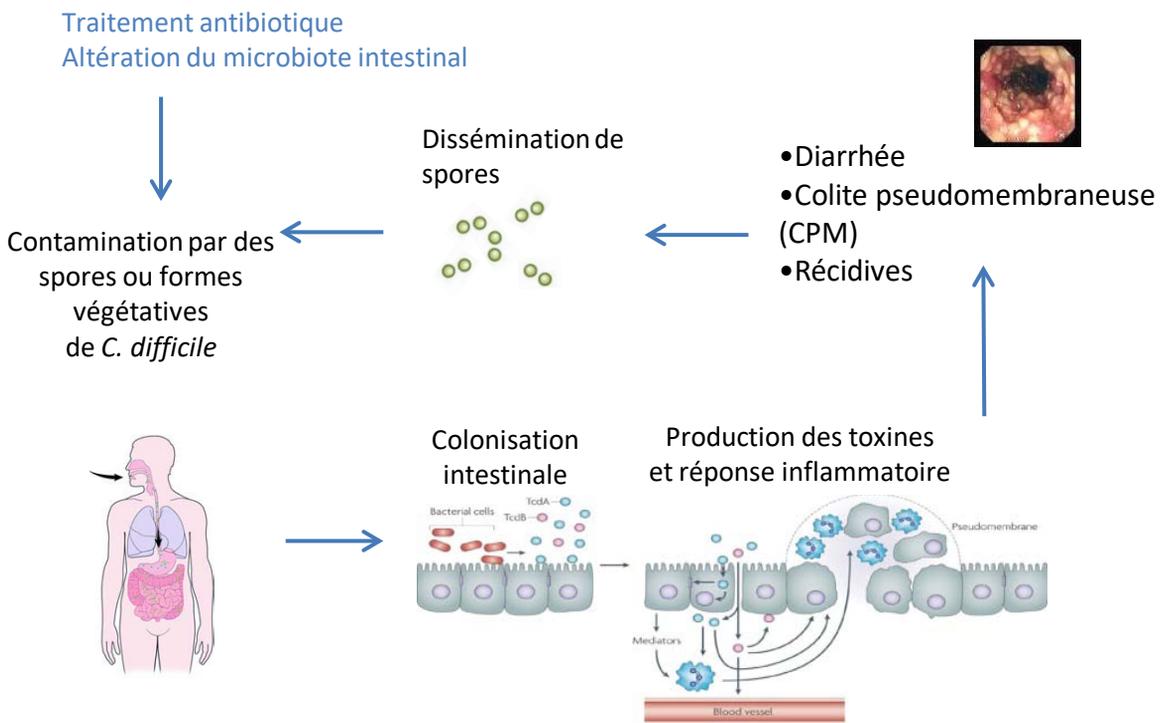
TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

UFC : Unité Formant Colonie

WT : Wild Type

# **Introduction**



**Figure 1:** Processus infectieux de *C. difficile*



# Introduction

*C. difficile* récemment renommé *Clostrioïdes difficile* (Lawson *et al.* 2016) est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, sporulé communément présent dans l'environnement et fréquemment isolé en milieu hospitalier. *C. difficile* est un entéropathogène responsable de diarrhées et de colites pseudomembraneuses le plus souvent consécutives à une antibiothérapie. Premièrement décrit en 1935 après son isolement à partir de selles de nouveau-nés, *C. difficile* était alors nommé *Bacillus difficilis* pour ses difficultés de mise en culture (Hall Ic and O'Toole E 1935). *C. difficile* était alors rarement isolé chez l'Homme et son rôle en tant que pathogène était sous-estimé (Smith and King 1962). Cependant, dès l'introduction sur le marché de la clindamycine, les colites associées au traitement sont rapidement devenues un problème de santé publique aux Etats-Unis (Tedesco *et al.* 1974). Bartlett *et al.* furent les premiers à considérer *C. difficile* comme bactérie toxigène responsable des colites associées à la clindamycine (Bartlett *et al.* 1978). Puis, suite à une moindre utilisation de la clindamycine et la faible connaissance de *C. difficile*, les infections à *C. difficile* (ICD) furent négligées. Cependant, suite à l'utilisation de nouvelles fluoroquinolones à large spectre, les cas d'ICD se multiplièrent en Amérique du Nord. L'augmentation de la morbidité et mortalité des ICD associée à des changements épidémiologiques au début des années 2000 dus à l'émergence de souches épidémiques et hypervirulentes, ainsi que l'augmentation du nombre de cas communautaires ont entraîné une réévaluation de ce pathogène comme un problème majeur de santé publique.

Les ICD sont le plus souvent suite à la destruction du microbiote intestinal de barrière, ce qui favorise l'implantation de *C. difficile*. Les bactéries adhèrent au tissu épithélial intestinal, se multiplient, sporulent et produisent les toxines TcdA et TcdB responsables de l'altération de l'épithélium, d'une réponse inflammatoire et de l'apparition des signes cliniques. Les ICD ont la particularité de récidiver, cela concernant environ 15 à 35% des patients dans les deux mois qui suivent un épisode initial. Malgré un deuxième traitement, 30 à 50% sont susceptibles de faire un troisième épisode d'ICD. Ceci peut être expliqué par la persistance endogène de *C. difficile* ou par l'acquisition d'une nouvelle souche d'origine exogène, associée à un microbiote intestinal altéré et à une faible réponse immunitaire (Barbut *et al.* 2000) (Figure 1).

En ce qui concerne le traitement des ICD, il est recommandé de cesser tout traitement antibiotique en cours si possible et ainsi favoriser le retour à la normale du microbiote

intestinal, ce qui permet une amélioration des symptômes dans 15 à 20% des cas. Si les symptômes persistent ou s'il est impossible d'arrêter les antibiotiques, un traitement par le metronidazole ou pour les cas les plus sévères un traitement par la vancomycine peut être conseillé. Cependant des souches de *C. difficile* résistantes et/ou moins sensibles apparaissent. Par ailleurs, ces traitements antibiotiques standards et couramment utilisés ont un large spectre d'action et ne permettent pas de limiter le risque de récurrence. En revanche, ils contribuent à l'accentuation des perturbations du microbiote intestinal et à la diminution de la résistance à la colonisation. Une alternative au traitement antibiotique consiste à rétablir le microbiote intestinal et son effet de barrière par transplantation fécale. Cela consiste à introduire une préparation constituée d'une dilution des selles d'un donneur sain dans le tube digestif du patient. Cette approche thérapeutique a fait l'objet de nombreuses études montrant son efficacité dans le traitement des infections récurrentes à *C. difficile*. Cependant, cette méthode présente des risques qui ne sont pas tous connus (Vindigni and Surawicz 2017).

La prévention des ICD et des récurrences est un enjeu majeur de santé publique et représente un défi thérapeutique. La vaccination, est une approche prophylactique prometteuse conférant une protection à long terme qui permettrait de limiter la dissémination de *C. difficile*. Bien qu'il n'existe à ce jour aucun vaccin contre *C. difficile* sur le marché, de nombreuses stratégies vaccinales sont en cours de développement. On distingue deux grandes stratégies, l'une ciblant les toxines de *C. difficile* et l'autre ciblant les composants de surface. Cibler les toxines permet de prévenir efficacement l'altération de l'épithélium intestinal et les signes cliniques des ICD chez l'animal, cependant aucune action sur la colonisation de l'hôte n'a été répertoriée avec cette stratégie. Chez l'homme, actuellement deux essais cliniques sont en phase III de développement (Pfizer, NCT03090191; Sanofi-Pasteur, NCT01887912). Cibler les composants de surface et la colonisation intestinale par *C. difficile* permettrait d'agir en amont de la libération des toxines et ciblerait directement *C. difficile* favorisant ainsi son élimination. Actuellement, seule une étude est en cours de développement clinique (phase I) ciblant à la fois un antigène de surface de la spore et une toxine de *C. difficile* (Cutting S.M., CDVAX, NCT02991417). De nombreuses cibles vaccinales jouant un rôle dans la colonisation intestinal par *C. difficile* ont été identifiées et sont actuellement testées chez l'animal. Les deux modèles animaux principaux pour étudier les ICD sont la souris et le hamster. La souris présente très peu de signes cliniques, mais ce modèle permet l'étude du processus de colonisation. Le hamster est très sensible aux ICD et développe des symptômes

qui conduisent le plus souvent au décès de l'animal ; ce modèle permet l'étude de la virulence de *C. difficile*.

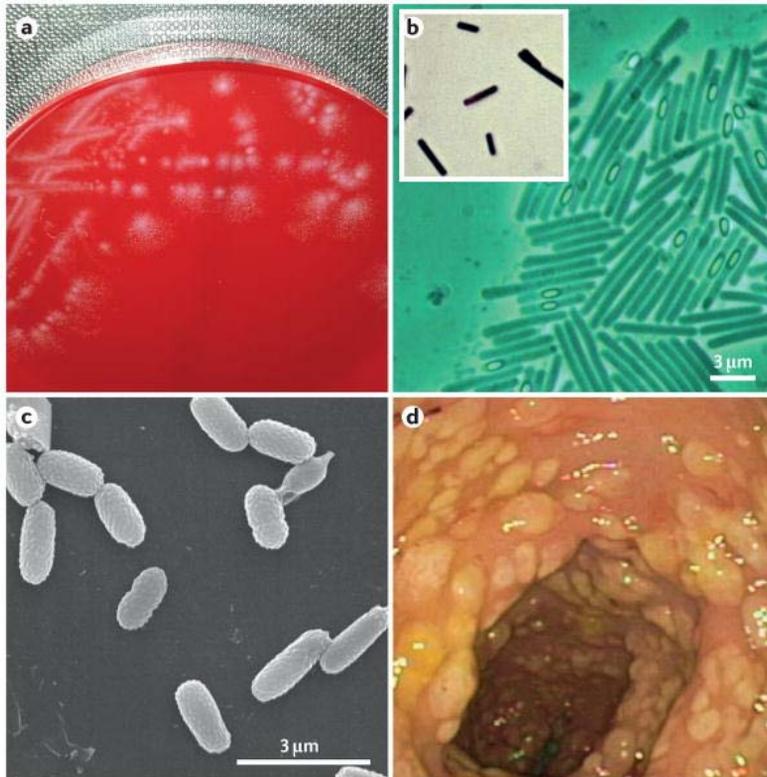
*C. difficile* est un pathogène entéro-toxique et non invasif, une immunothérapie efficace contre un tel pathogène doit agir au niveau de la muqueuse intestinale.

**L'objectif de ce projet de thèse et de participer au développement d'une stratégie vaccinale par voie muqueuse ciblant la colonisation intestinale par *C. difficile* dans des modèles souris et hamster.**

Dans une première partie, l'étude bibliographique présente *C. difficile* et la physiopathologie des ICD. Puis, la réponse immunitaire induite au cours des ICD sera développée. Enfin, l'ensemble des stratégies immuno-thérapeutiques contre *C. difficile* sera présentée sous forme de revue.

La deuxième partie concerne mes travaux personnels. L'étude de deux candidats vaccins utilisant deux composants de surface de *C. difficile* ont fait l'objet de quatre articles. Puis, deux nouveaux candidats vaccins ont été caractérisés. Enfin, un essai d'immunisation a associé des facteurs de colonisation à une toxine de *C. difficile*.

**Données  
bibliographiques**



**Figure 2.** **a.** Colonies de *C. difficile* sur gélose au sang **b.** Cellules végétatives de *C. difficile* et endospores observées par microscopie à contraste de phase; encadré en haut à gauche, coloration de Gram. **c.** Spores observées en microscopie électronique. **d.** Endoscopie de la muqueuse colique d'une colite pseudomembraneuse à *C. difficile*. En rose tissu sain, en jaune tissu inflammatoire et pseudomembranes. (Smits et al. Nat Rev Dis Primers, 2016)

# Données bibliographiques

## 1. Généralités sur les infections à *Clostridium difficile*

*C. difficile* est un bacille à Gram positif, anaérobie stricte et sporulé (Figure 2). Identifié dans les années 1970s comme un pathogène opportuniste responsable de diarrhées associées aux antibiotiques, cette bactérie a rapidement été perçue comme responsable d'infections nosocomiales. Actuellement, *C. difficile* est considéré comme un entéropathogène majeur responsable de diarrhées infectieuses récidivantes, et comme la première cause de colites pseudomembraneuses (CPM).

L'un des premiers facteurs de risque des infections à *C. difficile* (ICD) identifié fut le traitement par des antibiotiques à large spectre qui en agissant sur le microbiote intestinal entraîne une rupture de l'effet barrière. Cependant, les ICD peuvent être symptomatiques ou asymptomatiques. Ainsi, parmi les patients porteurs de *C. difficile*, certains développeront une simple diarrhée, d'autres des formes plus sévères d'ICD, alors que certains pourront être porteurs asymptomatiques. Les infections symptomatiques sont caractérisées par un large spectre de signes cliniques allant de la diarrhée modérée à la CPM parfois grave et mortelle avec iléus et mégacolon toxique. *C. difficile* est une bactérie ubiquitaire et peut-être transmise par diverses sources, humaine (patients symptomatiques ou asymptomatiques) (Eyre *et al.* 2013), animale, alimentaire (Rodriguez *et al.* 2016) et environnementale (Warriner *et al.* 2017).

Depuis le début des années 2000 l'incidence mondiale des ICD ainsi que la sévérité et le taux de récurrence augmentent. De plus, la proportion des ICD se manifestant chez des patients en dehors des services de soin est en nette augmentation et la frontière entre les ICD nosocomiales et communautaires est de moins en moins nette (Cohen *et al.* 2010; Chitnis *et al.* 2013; Anderson *et al.* 2017). Les études épidémiologiques ont décrit l'émergence de souches épidémiques hypervirulentes et ont montré une grande variété ainsi qu'une évolution continue des souches circulantes de *C. difficile* (Rupnik *et al.* 2009; Cairns *et al.* 2012).

Les recommandations américaines et européennes pour les traitements des ICD reposent sur une antibiothérapie adaptée selon la sévérité de l'infection. Cependant de nouvelles stratégies thérapeutiques s'avèrent efficaces telle que la transplantation fécale.

### 1.1. Définition et caractéristiques des infections à *C. difficile*

D'un point de vue clinique, les ICD peuvent être symptomatiques ou asymptomatiques. D'un point de vue biologique et épidémiologique, les ICD sont définies par la détection de *C. difficile* et de ses toxines dans les selles de patients diarrhéiques. D'après l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases (ESCMID), une ICD est définie par : i) un tableau clinique compatible (diarrhée, iléus, mégacôlon toxique) associé à des preuves microbiologiques (présence de *C. difficile* et de toxines libres dans les selles) en absence de preuve d'autre cause de diarrhée ; ii) ou par la présence d'une CPM diagnostiquée lors d'une endoscopie, colectomie ou autopsie. Le terme ICD fait en général référence aux infections symptomatiques par opposition au portage asymptomatique (Crobach *et al.* 2009; Crobach *et al.* 2016). L'ESCMID recommande de diagnostiquer les ICD par la détection de *C. difficile* toxinogène et des toxines à partir de selles diarrhéiques (Debast *et al.* 2014). Les examens biologiques recommandés par l'ESCMID pour détecter *C. difficile* sont : la coproculture avec recherche spécifique de *C. difficile*, la recherche des gènes codant les toxines par PCR, les méthodes immunoenzymatiques (EIA pour enzyme immunoassay) pour détecter une enzyme produite par toutes les souches de *C. difficile*, la glutamate déshydrogénase (GDH) et les toxines A et/ou B (Debast *et al.* 2014; Crobach *et al.* 2016). Différents algorithmes ont été proposés pour obtenir une sensibilité et une spécificité optimales (Goret *et al.* 2015).

Quel que soit l'hôte, les signes cliniques d'une ICD comprennent des diarrhées profuses (mucoïdes, verdâtres, malodorantes et aqueuses) accompagnées de fièvre et de douleurs abdominales associées à une inflammation colique. Les diarrhées sévères sont souvent associées à une CPM avec hémorragie et ulcérations profondes (Figure 2). Bien que les colites à *C. difficile* puissent se manifester tout le long du colon, les plus sévères chez l'Homme touchent le colon distal et le rectum. En cas de colite au niveau du colon droit, celle-ci peut s'accompagner de faible ou d'aucune diarrhée. Dans ce cas les signes cliniques incluent la fièvre, une vive douleur colique droite et une faible motilité intestinale. Dans les cas d'ICD sévères, des complications peuvent survenir telles qu'une sévère dilatation du colon (mégacôlon toxique), une perforation colique, pouvant conduire à un sepsis et un syndrome de défaillance multiviscérale potentiellement mortel. L'ESCMID a listé les marqueurs pronostiques pour un risque accru d'ICD sévères (Debast *et al.* 2014). Ces marqueurs incluent : i) l'âge avancé ( $\geq 65$  ans) ; ii) un taux de leucocytes  $> 15 \times 10^9/L$  le jour du diagnostic ; iii) une albuminémie  $< 30g/L$ ; iv) une créatininémie  $\geq 133 \mu M$ ; v) une

comorbidité, maladie sous-jacente et une immunodéficience (ex : cancer, maladie cardiovasculaire, respiratoire et rénale, maladie pulmonaire ou rénale chronique, diabète, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin).

Les ICD peuvent être d'origine nosocomiale ou communautaire. Les ICD communautaires au sens strict (community-associated CDI) se définissent comme des ICD dont les premiers symptômes se déclarent en dehors de tout séjour en institution ou dans les premières 48h d'hospitalisation chez des patients qui n'ont pas été admis dans un établissement de soins dans les 12 semaines avant le diagnostic. Les ICD communautaires associées à un établissement de soins (community-onset health-care-facility-associated CDI) se définissent comme des ICD diagnostiquées chez des patients qui ont quitté un établissement de soins dans les quatre semaines précédant le diagnostic. Les ICD indéterminées (indeterminate-CDI) correspondent à des ICD chez des patients qui ont quitté un établissement de soins entre 4 et 12 semaines avant le diagnostic. Les ICD nosocomiales (health-care-facility-onset health-care-facility-associated) correspondent à des ICD diagnostiquées dans un établissement de soins après 48h après l'admission (Cohen *et al.* 2010).

Le portage asymptomatique est caractérisé par la présence chez l'hôte de *C. difficile* toxigène ou non, sans manifestation clinique. Cette définition ne permet pas de différencier un portage transitoire d'une colonisation persistante. Le terme colonisation correspond à la présence prolongée d'une population bactérienne au cours du temps, témoignant donc d'un équilibre entre la croissance et la clairance bactérienne (Adlerberth 2000; Donskey *et al.* 2015).

Un des problèmes majeurs lié aux ICD est le nombre important de récurrences. Une récurrence est définie par un nouvel épisode infectieux dû à *C. difficile* entre deux et huit semaines après une première infection guérie avec ou sans traitement (McDonald *et al.* 2007). Une récurrence peut être due à la persistance de la souche responsable de la primo-infection, il s'agit alors d'une rechute. Dans d'autres cas, la récurrence est due à une nouvelle contamination par une souche d'origine exogène, il s'agit alors de ré-infection (Barbut *et al.* 2000). Le taux de récurrence après un premier épisode se situe entre 20-30 % et peut atteindre 60 % après une première récurrence (Shields *et al.* 2015). Les marqueurs pronostiques pour les ICD récurrentes incluent : i) l'âge > 65 ans; ii) la poursuite d'un traitement antibiotique (indépendamment du traitement de l'ICD) après diagnostic et /ou après traitement d'une ICD ; iii) comorbidité et/ou défaillance rénale ; iv) l'utilisation d'inhibiteur de pompe à protons ; vi) la sévérité initiale de l'infection (Debast *et al.* 2014).



## 1.2. Facteurs de risque

Les ICD surviennent le plus souvent dans un contexte particulier. Les facteurs de risque des infections à *C. difficile* sont liés à un environnement favorisant l'exposition, à la prise de médicaments essentiellement des antibiotiques et à l'hôte.

### *Facteurs favorisant l'exposition à C. difficile en milieu hospitalier*

L'acquisition de *C. difficile* en milieu hospitalier peut être favorisée par la promiscuité entre les patients et la persistance de spores dans l'environnement malgré le respect des règles d'hygiène (Chang and Nelson 2000; Eyre *et al.* 2013). La fréquence et la durée des séjours à l'hôpital augmentent les risques notamment dans les établissements de soins intensifs (Davies *et al.* 2014; Krishna *et al.* 2017). Le risque accru d'ICD en milieu hospitalier peut s'expliquer par la fragilité de l'état de santé des patients, une transmissibilité inter-patient par manu portage, la résistance des spores de *C. difficile* dans l'environnement et la difficulté de décontamination des surfaces et du matériel médical (Weber *et al.* 2013).

### *Facteurs favorisant la colonisation*

Presque toutes les classes d'antibiotiques ont été incriminées dans la survenue des ICD. Les antibiotiques à large spectre réduisent la taille et la diversité de la population bactérienne intestinale, diminuant ainsi la résistance à la colonisation et, permettant l'implantation et la prolifération de *C. difficile* dans l'intestin (Britton and Young 2014). Les antibiotiques qui semblent induire un plus grand risque sont la clindamycine, les pénicillines, les céphalosporines et les fluoroquinolones (Owens *et al.* 2008; Deshpande *et al.* 2013).

La clindamycine a été le premier antibiotique associé aux colites pseudomembraneuses (Tedesco *et al.* 1974). En effet, la clindamycine induit une forte diminution de la population bactérienne anaérobie (clostridies, *Bacteroides*, bifidobacteries) et une augmentation des entérocoques et des entérobactéries (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) (Orrhage *et al.* 1994). Les modifications du microbiote intestinal induites par la clindamycine sont rapides et une période de trois mois après la fin du traitement est nécessaire au rétablissement complet du microbiote. Cependant les modifications de la population des *Bacteroides* semblent persister au moins deux ans après traitement (Jernberg *et al.* 2007).

Les  $\beta$ -lactamines à large spectre comme les aminopénicillines (amoxicilline, association amoxicilline-acide clavulanique) et les céphalosporines telles que céfotaxime et ceftriaxone sont reconnues pour leur potentialité à induire des ICD (Owens *et al.* 2008). Les traitements par l'amoxicilline et l'association amoxicilline/acide clavulanique, compte tenu de leur large utilisation en dehors de séjour en institution, sont des facteurs de risque importants pour les ICD communautaires (Dantes *et al.* 2015). L'association amoxicilline/acide clavulanique induit une importante augmentation des entérobactéries et une diminution des bifidobactéries (Sullivan *et al.* 2001; Young and Schmidt 2004). Avant les années 2000, les céphalosporines étaient les antibiotiques les plus souvent responsables d'ICD notamment en raison de leur utilisation fréquente à l'hôpital et de la résistance de *C. difficile* à ces molécules (Bignardi 1998; Gerding 2004). En effet, le large spectre d'action des céphalosporines induit d'importantes altérations du microbiote intestinal particulièrement pour celles qui ont un cycle entéro-hépatique comme la ceftriaxone (Sullivan *et al.* 2001).

Actuellement, la liste des antibiotiques à fort risque d'induire des ICD s'étend aux fluoroquinolones à large spectre ciblant les bactéries anaérobies strictes (*Bifidobacteria*, *Bacteroides*) (Sullivan *et al.* 2001; Baines and Wilcox 2015). Ainsi l'utilisation de la moxifloxacine a été associée à l'émergence de souches dites « hypervirulentes », résistantes à cet antibiotique et qui ont été responsables d'épidémies dans le monde entier (Gerding 2004; He *et al.* 2013).

En dehors des antibiotiques, d'autres traitements capables d'entraîner une perturbation du microbiote intestinal sont susceptibles d'augmenter le risque d'ICD. Par exemple, les inhibiteurs de pompes à protons (IPP) ont été associés aux ICD. Outre leur action réduisant l'acidité gastrique favorisant ainsi la contamination par *C. difficile*, les IPP sont aussi capables d'altérer la diversité du microbiote intestinal (Seto *et al.* 2014). Certaines chimiothérapies anticancéreuses comme le méthotrexate induisent de nombreux effets secondaires incluant l'altération du système immunitaire, de la muqueuse intestinale et de son microbiote et sont également associées à la survenue des ICD.

Ainsi, les patients atteints d'ICD présentent un microbiote intestinal avec profil particulier. De nombreuses études se sont intéressées aux altérations microbiennes associées à la colonisation par *C. difficile* et à l'infection chez l'Homme. Une analyse par séquençage des ARNs ribosomiaux 16S (ARNr 16S) a montré une réduction de la diversité du microbiote intestinal chez les patients âgés atteints d'ICD comparés à des patients sains, porteurs ou non de *C. difficile* (Rea *et al.* 2012). Parmi les groupes bactériens fécaux associés à la colonisation par

*C. difficile* et aux ICD, on trouve de manière non exhaustive une augmentation de *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*) et de certains clusters de *Clostridium* associée à une diminution des *Bacteroidetes* (*Bacteroides* and *Prevotella*), *Bifidobacterium*, *Alistipes*, *Roseburia*, *Coprococcus* (Vincent and Manges 2015).

#### *Facteurs liés à l'hôte*

Le premier facteur de risque chez l'Homme est l'âge avancé  $\geq 65$  ans (Cohen *et al.* 2010; Debast *et al.* 2014). Ce facteur peut être à la fois expliqué par le mécanisme de sénescence immunitaire et par l'évolution naturelle du microbiote intestinal des personnes âgées (Bischoff 2016).

La capacité à développer une réponse immune spécifique et efficace contre *C. difficile* est un facteur clé intervenant dans la sévérité et la durée des ICD sur lequel nous reviendrons ultérieurement. De manière générale l'immunodéficience est associée à un risque accru d'ICD sévère. Une étude aux États-Unis entre 2005 et 2011 sur plus d'1 million de patients atteints de leucémie, a montré que le risque d'ICD dans cette population était 2.6 fois plus important que chez des patients non atteints de leucémie (Luo *et al.* 2015). De même les patients atteints d'hypogammaglobulinémie associée à un traitement post-transplantation d'organe, ou bien les patients immunodéprimés à la suite d'une infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) sont autant de facteurs de risque d'ICD (Muñoz *et al.* 2007; Di Bella *et al.* 2015; Origüen *et al.* 2015). Cependant, d'après les recommandations européennes, l'immunodéficience ne doit pas être considérée comme un facteur de risque mais comme facteur influençant la sévérité ou la durée des ICD. Par ailleurs, de nombreuses comorbidités sont associées aux ICD sévères telles que le cancer, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies chroniques pulmonaires ou rénales (Debast *et al.* 2014).

#### *Facteurs de risque des ICD communautaires*

En ce qui concerne les ICD communautaires strictes, les facteurs de risque peuvent être différents des ICD nosocomiales (Bloomfield and Riley 2016). Le contact fréquent avec des porteurs asymptomatiques tels que les enfants de moins de deux ans (Wilcox *et al.* 2008; Rousseau *et al.* 2012; Chitnis *et al.* 2013) ou l'exposition à des animaux d'élevage (Keessen *et*

al. 2013a; Knetsch *et al.* 2014) sont des facteurs de risque pour les infections communautaires, fréquemment diagnostiquées dans une population plus jeune que dans le cas des ICD nosocomiales. Ainsi, si certaines études montrent un rôle important des traitements antibiotiques pour les ICD communautaires (Deshpande *et al.* 2013), d'autres montrent de fortes proportions de cas d'ICD communautaires (de 36 à 64 %) non associés aux antibiotiques (Chitnis *et al.* 2013; Collins *et al.* 2014a). En revanche, les études semblent s'accorder sur le rôle des inhibiteurs de pompe à protons comme facteur de risque des ICD communautaires; leur utilisation semble avoir un effet particulièrement significatif sur l'apparition des ICD communautaires non associées aux antibiotiques (Chitnis *et al.* 2013). Cela suggère que l'altération du microbiote induite par les inhibiteurs de pompe à protons (Seto *et al.* 2014) semble être suffisante pour faciliter le développement d'une infection.

### 1.3. Épidémiologie

#### *Les infections à C. difficile nosocomiales*

Les patients hospitalisés atteints d'ICD constituent le premier réservoir de la bactérie. La plupart des données épidémiologiques sur les ICD concernent principalement l'Amérique du Nord, l'Europe et plus particulièrement le Royaume-Uni où la surveillance des ICD chez l'Homme est obligatoire. Depuis les années 2000, l'épidémiologie a extrêmement changé avec l'augmentation de l'incidence, de la morbidité et de la mortalité des ICD en Amérique du Nord (Canada, Etats-Unis), puis en Europe (Kuijper *et al.* 2006). Au début des années 2000, des cas épidémiques sont apparus au Québec avec une augmentation de l'incidence des ICD en milieu hospitalier de 35.6 cas pour 100000 personnes en 1991 à 156.3 pour 100000 en 2003 associée à une sévérité accrue de 7.1 % (Pépin *et al.* 2004; Loo 2005; Pépin *et al.* 2005). L'épidémie s'est simultanément étendue aux Etats-Unis où le nombre de cas d'ICD a doublé entre 1996 et 2003 (McDonald *et al.* 2006) et n'a fait qu'augmenté la décennie suivante. En 2011, une surveillance annuelle des ICD nosocomiales et communautaires a permis d'estimer l'incidence, le taux de récurrence et de mortalité des ICD sur une population totale de 11.2 millions d'habitants (Lessa *et al.* 2015). Ainsi, l'incidence aux Etats-Unis a été estimée à 95.3 cas nosocomiaux pour 100000 habitants, le taux de première récurrence a été estimé à 20.9 % dans les établissements de soins et le taux de mortalité dans les 30 jours après le diagnostic à

9.3 %. Une étude rétrospective allant de 2001 à 2012 rapporte une augmentation de 188.8 % du taux d'incidence des ICD à récurrences multiples aux Etats-Unis (Ma *et al.* 2017). Cependant aux Etats-Unis, le Center for Disease Control (CDC) dans son dernier rapport de 2016 sur l'évolution des infections nosocomiales décrit une diminution des ICD nosocomiales de 8 % entre 2011 et 2014 (Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report).

En Europe, au début des années 2000, deux grandes épidémies se sont déclarées au Royaume-Uni, l'une entre octobre 2003 et juin 2004 à l'hôpital de Stoke Mandeville (Buckinghamshire Hospitals NHS Trust) avec 174 cas et 19 morts puis une seconde dans le même hôpital entre octobre 2004 et juin 2005 avec 160 cas et 19 morts (Smith 2005). Les épidémies se sont étendues en Europe, d'abord aux Pays-Bas, puis en Belgique et en France (Kuijper *et al.* 2006). Entre 2012 et 2013, une étude multicentrique (EUCLID), comprenant 482 hôpitaux européens répartis dans 20 pays recensant les ICD, a estimé en moyenne l'incidence à sept cas d'ICD pour 10000 patients-jours dans les hôpitaux (Davies *et al.* 2014). Une autre étude de surveillance des ICD en Europe en 2013 sur 37 hôpitaux dans 14 pays a rapporté un taux d'incidence d'ICD nosocomiales variable entre 0,6 et 18,5 pour 10000 patients-jours, dont 10 % des épisodes d'ICD était des récurrences (van Dorp *et al.* 2016). En France, l'incidence des ICD a augmenté de 2.2 à 3.6 pour 10000 patients-jours entre 2009 (Eckert *et al.* 2013) et 2012 (Barbut *et al.* 2015). Cette augmentation était associée à un excès de mortalité (Barbut *et al.* 2017).

La répartition des ICD est maintenant mondiale, des épidémies à *C. difficile* ont été recensées en Indonésie (Collins *et al.* 2017a), en Australie (Collins *et al.* 2017b), en Amérique du Sud (Plaza-Garrido *et al.* 2016) et en Afrique (Seugendo *et al.* 2015). Notamment la prévalence des ICD en Asie est aussi élevée que pour les pays occidentaux (Borren *et al.* 2017).

D'un point de vue économique, les ICD liées aux soins ont un fort impact sur les coûts de prise en charge des patients et sur les coûts de santé publique en raison d'une hospitalisation prolongée, des réadmissions liées aux récurrences, des coûts diagnostiques, thérapeutiques et aussi liés aux mesures d'hygiène. Aux Etats-Unis, l'impact économique des ICD pour les établissements de santé a été estimé à environ 4.7 milliards de dollars par an (Desai *et al.* 2016). En France, le coût supplémentaire attribué par les ICD aux hôpitaux publics a été extrapolé à 163.1 millions d'euros au niveau national dont 12.5 % sont attribués aux récurrences (Le Monnier *et al.* 2015).

### *Les infections communautaires à C. difficile*

Comme pour les ICD nosocomiales, l'incidence des ICD communautaires a augmenté depuis les années 2000. En 2011, près de la moitié des cas d'ICD recensés aux Etats-Unis était d'origine communautaire, l'incidence nationale des ICD communautaires aux Etats-Unis a été estimée à 51.9 cas pour 100000 habitants. Le taux de première récurrence a été estimé à 13.5 % parmi les cas communautaires (Lessa *et al.* 2015) et le taux de mortalité dans les 30 jours après le diagnostic était de 1.3 % (Lessa *et al.* 2015). En Europe en 2013, 16 % des ICD étaient d'origine communautaire ou indéterminée (van Dorp *et al.* 2016). Cependant, les ICD communautaires restent encore difficilement diagnostiqués (Beaugerie *et al.* 2003) et l'impact économique est difficilement calculable.

### *Le portage asymptomatique*

Les porteurs de *C. difficile* asymptomatiques constituent un réservoir de la bactérie et une source potentielle de transmission. Le portage asymptomatique est particulièrement important chez les nourrissons et les enfants de moins de deux ans qui peuvent être colonisés par des souches non toxigènes ou toxigènes (Enoch *et al.* 2011; Rousseau *et al.* 2012). Rousseau *et al.* ont montré que les mêmes souches toxigènes circulaient chez les enfants et les adultes atteints d'ICD.

Chez l'adulte, le portage asymptomatique est fréquent dans les hôpitaux variant de 7 à 18% selon les études (McFarland *et al.* 1989; Kyne *et al.* 2000; Alasmari *et al.* 2014). La fréquence du portage asymptomatique est plus faible en dehors des établissements de santé.

En Irlande, Rea *et al.* ont rapporté un portage asymptomatique de *C. difficile* en milieu communautaire strict chez 2 % des personnes âgées contre 10 % chez des sujets exposés à des soins ambulatoires et 21 % chez des sujets dans les établissements hospitaliers (Rea *et al.* 2012). Une méta-analyse incluant neuf études entre 1990 et 2012, principalement d'Amérique du Nord, a montré que le taux de portage asymptomatique de souches toxigènes parmi les patients d'établissements de soins de longue durée s'élevait à 14,8 % (Ziakas *et al.* 2015). Dans une étude locale aux Etats-Unis en 2013, Galdys *et al.* ont rapporté la présence uniquement de *C. difficile* toxigène dans les selles de 7 % de personnes en bonne santé vivant en milieu communautaire (Galdys *et al.* 2014).

### *Les infections à C. difficile chez l'animal*

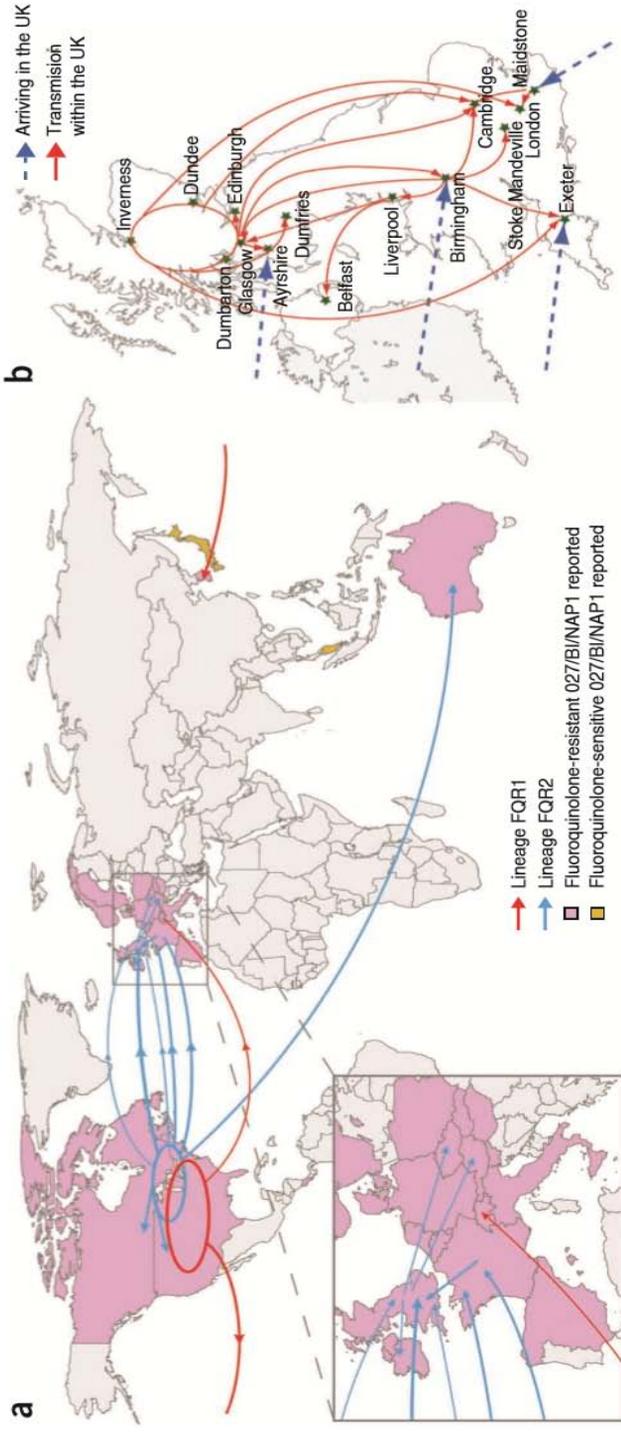
*C. difficile* est une bactérie ubiquitaire avec une grande variété d'hôtes (humain, bovin, équin, ovin-caprin, aviaire, félin, canin, rongeur etc...) élargissant ainsi les études épidémiologiques au domaine vétérinaire.

Chez l'animal, les signes cliniques des ICD sont variables en fonction des espèces et rendent difficile le diagnostic. Cependant, de nombreuses études montrent une importante prévalence des ICD dans différents types d'élevage animal allant du porc aux rongeurs en passant par l'élevage bovin et équin. En particulier, les ICD ont un impact majeur dans l'élevage porcin et équin.

Les coûts financiers liés aux pertes et aux traitements associés aux ICD n'ont pas encore été estimés. *C. difficile* peut induire une perte de poids des animaux d'élevage et des retards de production ainsi que des pertes animales (Rodriguez *et al.* 2016; Moono *et al.* 2016).

Une étude d'une durée de 12 ans de surveillance des entéropathogènes du porc dans un hôpital vétérinaire de l'Iowa, a montré que la fréquence des ICD était de l'ordre de 55 % des cas d'infections digestives et était en progression comparée aux autres entéropathogènes (Yaeger *et al.* 2002). La prévalence de *C. difficile* toxigénique chez les porcelets varie selon les études de 23 % à 93 % pour les porcelets (de 1 à 7 jours) diarrhéiques et de 1 à 96 % pour des porcelets asymptomatiques (Rodriguez *et al.* 2016). Dix à 15 % des porcelets atteints d'ICD sont en sous-poids et ont un temps de sevrage prolongé. En Australie une étude sur trois fermes différentes a rapporté un taux de mortalité variant de 11 à 14 % (Squire *et al.* 2013).

Actuellement *C. difficile* est considéré comme l'une des plus importantes causes de diarrhée et d'entérocolite chez les poulains et les chevaux. La prévalence des ICD chez les poulains et les chevaux adultes varie considérablement selon les études allant de 5 % jusqu'à 63 %. Comme chez l'Homme les signes cliniques des ICD chez les chevaux sont variés et peuvent être plus ou moins sévères. Le taux de mortalité des poulains et chevaux est variable selon les études et peut atteindre près de 40 % (Diab *et al.* 2013).



**Figure 3.** Dissémination des souches BI/NAP1/027. **a.** Dissémination mondiale des lignées FQR1 (en rouge) et FQR2 (en bleu). **b.** Arrivée et dissémination de la lignée FQR2 au Royaume-Uni (He et al. Nat Genet. 2012)

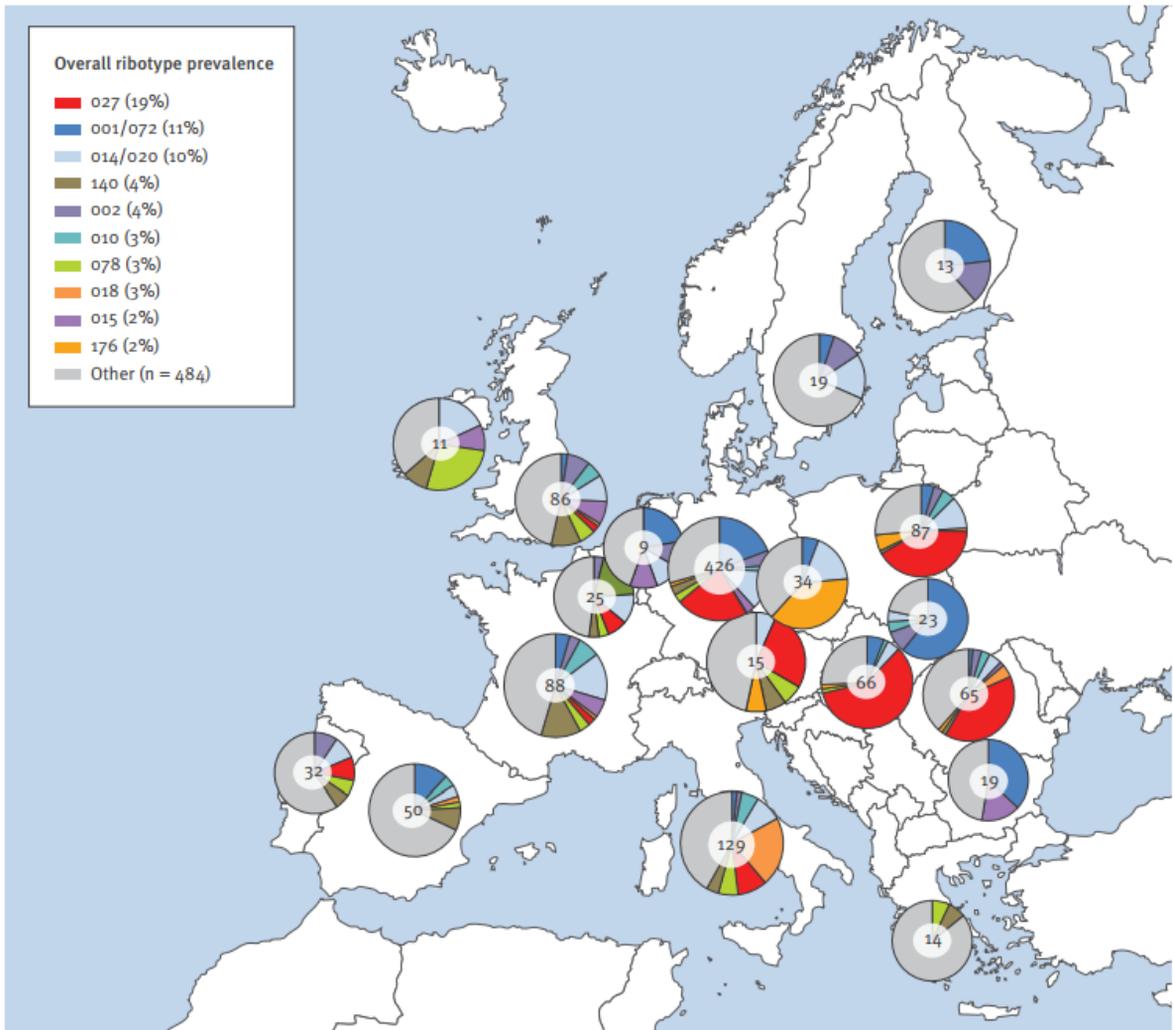


### *Les souches circulantes de C. difficile*

Différentes techniques de typage moléculaire ont été utilisées pour caractériser les souches circulantes, ce qui rend parfois difficile la comparaison des données. Trois techniques ont été fréquemment utilisées: le typage par restriction enzymatique (REA pour restriction endonuclease analysis), le typage par électrophorèse en champs pulsé (NAP pour North American pulsotype) surtout utilisés aux Etats-Unis, et le ribotypage (PCR-ribotype) largement utilisé en Europe.

Dès le début des années 2000, l'incidence et la sévérité des ICD ont augmenté au Canada et aux Etats Unis puis en Europe. Ceci a été lié à l'émergence de souches épidémiques dites "hypervirulentes" désignées par les différentes méthodes de typage BI/NAP1/027 (REA type BI, North American pulsotype 1, ribotype 027) (Loo 2005; Warny *et al.* 2005; McDonald *et al.* 2005). Ces souches « 027 » se caractérisent par une virulence accrue (Warny *et al.* 2005), une résistance aux antibiotiques en particulier aux methoxyfluoroquinolones (Gerding 2004; Biller *et al.* 2007; Spigaglia *et al.* 2008) et une capacité de transmission importante (Cartman *et al.* 2010; He *et al.* 2013). Par séquençage de génome entier (whole genome sequencing) et analyse phylogénétique, une étude a décrit l'évolution et la répartition mondiale des épidémies liées à ces souches 027 (He *et al.* 2013). Ainsi, deux lignées distinctes de souches 027 ont émergé indépendamment à la même période au début des années 2000 en Amérique du Nord. Les souches de ces deux lignées ont acquis la même mutation conférant une résistance aux fluoroquinolones et ont été nommées FQR1 et FQR2 (pour fluoroquinolone resistance). Ces deux lignées FQR1 et FQR2 ne présentent pas le même historique de dissémination à travers le monde. La première souche FQR1 a été isolée en 2001 à Pittsburg Pennsylvanie et est essentiellement restée localisée en Amérique du Nord entre 2001 et 2007 avec des apparitions sporadiques en Suisse et en Corée du Sud entre 2007 et 2010. L'origine de la lignée FQR2 est moins précise mais se localise aussi en Amérique du Nord. La lignée FQR2 présente une distribution mondiale plus large que la lignée FQR1 notamment en Australie, au Royaume-Uni ainsi que dans toute l'Europe (Figure 3). Au Royaume-Uni, la lignée FQR2 a été notamment responsable des deux grandes épidémies de Stoke Mandeville (Smith 2005). En Europe au début des années 2000, la majorité des épidémies nosocomiales d'ICD était causée par des souches 027 FRQ2 (Kuijper *et al.* 2006; Bauer *et al.* 2011).

Actuellement ces souches hypervirulentes 027 peuvent être retrouvées sur tous les continents, cependant elles ne sont pas uniques et la population de souches de *C. difficile* circulantes est très hétérogène. Cette hétérogénéité est mondiale, aux Etats-Unis entre 2011 et 2013, une



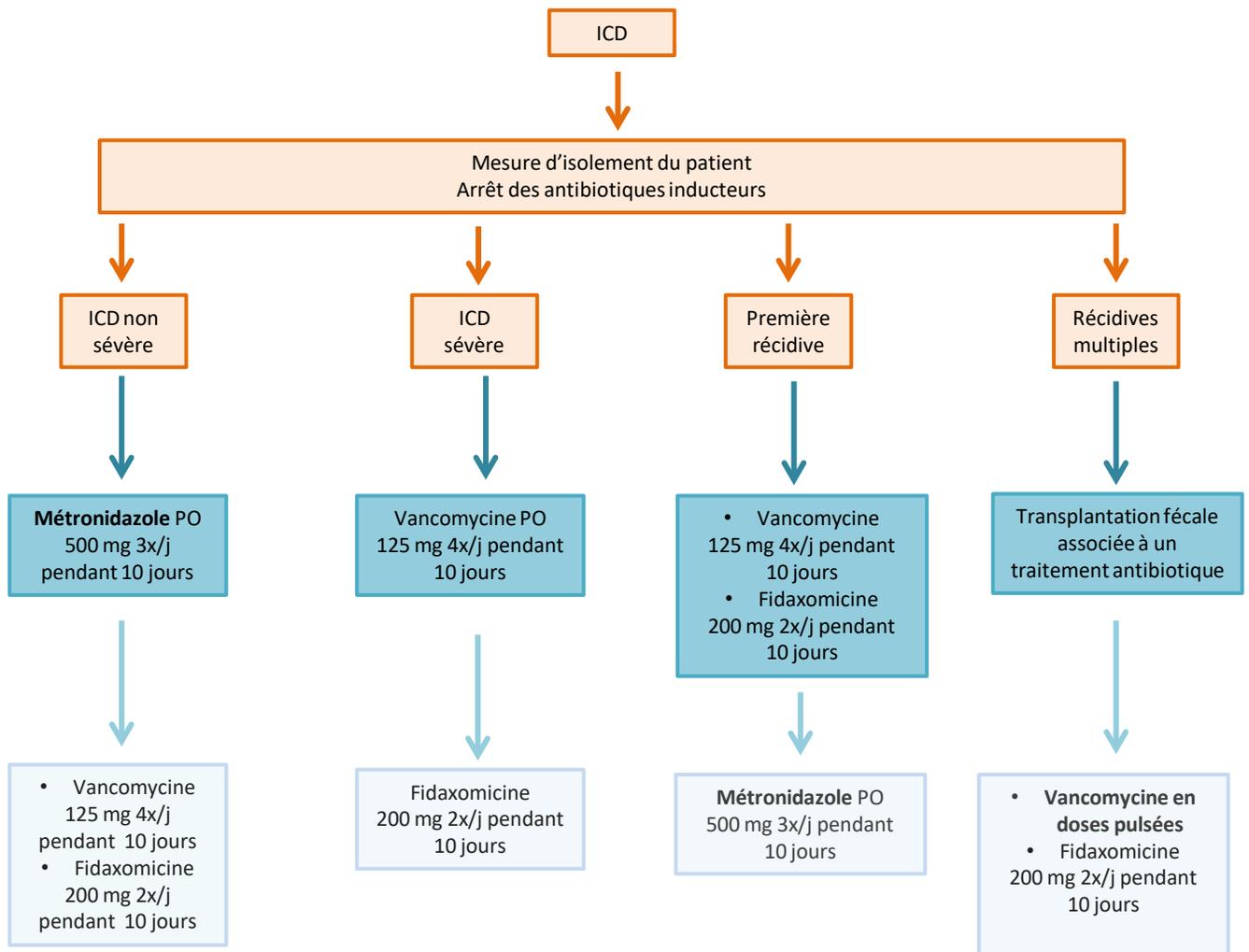
**Figure 4.** Répartition des ribotypes de *C. difficile* en Europe (2012-2013). Les diagrammes représentent la proportion des ribotypes les plus fréquents, le nombre au centre indique le nombre d'isolats étudiés. (Davies et al. Euro Surveill. 2016)

étude a déterminé 29 ribotypes différents parmi des souches circulantes dans 32 hôpitaux à travers le pays. Les trois souches principalement isolées étaient par ordre décroissant les souches de PCR-ribotype 027 (28.1 %), 014/020 (12.4 %), 106 (6.1 %) (Tickler *et al.* 2014). Une autre étude aux Etats-Unis a montré la présence de 98 ribotypes dans 720 isolats cliniques (Waslawski *et al.* 2013) et en Australie 32 ribotypes différents ont été retrouvés dans 70 échantillons (Foster *et al.* 2014).

Actuellement en Europe, les souches 027 ne sont plus majoritairement retrouvées et on observe une répartition différente en fonction des pays. En Europe de l'Ouest (Autriche, Belgique, France, Allemagne, Pays-Bas), la prévalence des ICD causées par ces souches diminue. De même, les souches 027 ne sont plus majoritaires en Europe du Nord (Finlande, Suède, Irlande, Royaume-Uni) et du Sud (Grèce, Italie, Portugal, Espagne), alors qu'elles sont dominantes (35 %) en Europe de l'Est (Bulgarie, République Tchèque, Hongrie, Pologne, Roumanie et Slovaquie) (Davies *et al.* 2016). En outre, ces souches ne sont pas remplacées par d'autres souches dominantes, mais une plus grande diversité de souches est apparue (Figure 4). Ainsi en Europe entre 2012 et 2013, on observait 125 ribotypes différents isolés à partir de 1196 isolats cliniques dans 19 pays différents (Davies *et al.* 2016). En moyenne les souches isolées le plus fréquemment étaient de ribotype 027 (19 %), 001/072 (11 %) et 014/020 (10 %). Dans cette étude, la prévalence du ribotype 027 est inversement proportionnelle à la diversité générale des ribotypes isolés. La variété des souches circulantes témoigne du dynamisme d'évolution de *C. difficile* (Cairns *et al.* 2012) avec l'émergence probable de nouvelles souches épidémiques (078, 017, 012, 014/020, 084, 023, etc...) et hypervirulentes à travers le monde (Plaza-Garrido *et al.* 2016; Cairns *et al.* 2017; Collins *et al.* 2017b; Collins *et al.* 2017a).

Ainsi, les souches de ribotype 078 sont de plus en plus isolées chez l'Homme notamment parmi les cas d'ICD communautaires. Comme pour les souches de ribotype 027, les souches de ribotype 078 ont une sensibilité diminuée aux antibiotiques et semblent avoir une virulence accrue (Goorhuis *et al.* 2008; Keessen *et al.* 2013b; Álvarez-Pérez *et al.* 2017).

Chez l'animal comme chez l'Homme, il existe une grande diversité de souches circulantes et le ribotype 078 est majoritaire notamment dans les élevages porcins et bovins (Moono *et al.* 2016). De façon intéressante, les souches de ribotype 078 sont fréquemment retrouvées chez les animaux d'élevage et témoignent d'une transmission des souches de l'animal à l'homme et réciproquement. Les comparaisons de souches cliniques humaines et animales ont révélé que dans certaines régions, les animaux et les hommes pouvaient être colonisés avec des souches



**Figure 5.** Recommandations européennes de traitement des ICD.

En bleu foncé, traitements de première intention. En bleu clair, traitement de deuxième intention.

PO: *per os*

(Adapté de Debast et al. Clin Microbiol Infect. 2014).

identiques de *C. difficile* ou issues de la même lignée. Les similitudes dans la distribution des souches indiquent que *C. difficile* peut contaminer facilement l'Homme et l'animal et que des réservoirs communs peuvent exister (Gupta and Khanna 2014).

En conséquence, *C. difficile* peut être considéré comme un agent pathogène zoonotique et les animaux pourraient jouer un rôle important en tant que réservoirs de la bactérie (Rodriguez *et al.* 2016).

#### **1.4. Traitements et prises en charge des infections à *C. difficile***

Les recommandations de l'ESCMID pour traiter les ICD dépendent de la gravité de l'infection: ICD initiale non sévère, ICD sévère, risque de récurrences simples ou multiples (Debast *et al.* 2014) (Figure 5).

Pour une ICD initiale non sévère dans une situation non épidémique et avec un cas induit par un traitement antibiotique, il est recommandé d'arrêter le traitement antibiotique et d'observer la réponse clinique dans les 48h. En cas d'inefficacité de l'arrêt de l'antibiothérapie, le métronidazole par voie orale est recommandé en première intention pour une infection légère à modérée. Pour les cas d'ICD sévères, la vancomycine par voie orale est recommandée en première intention. En cas de première récurrence, un traitement *per os* par la vancomycine ou la fidaxomicine peut être envisagé. Face aux ICD à récurrences multiples, la vancomycine en doses pulsées ou la fidaxomicine peuvent être prescrites (Debast *et al.* 2014). Cependant pour les ICD à récurrences multiples, il est fortement recommandé d'associer un traitement antibiotique par la vancomycine avec une transplantation fécale pour restaurer la résistance naturelle à la colonisation par un microbiote sain (van Nood *et al.* 2013; Debast *et al.* 2014). Récemment, pour réduire le risque de récurrences multiples, une stratégie d'immunothérapie passive prescrite en association avec un traitement antibiotique vient d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché par la Food and Drug Administration aux Etats Unis et l'European Medicines Agency en Europe.

Les mesures de traitements additionnels incluent : l'arrêt de traitement antibiotique si possible, la non utilisation de médicaments diminuant la motricité intestinale et si possible d'inhibiteurs de pompes à protons.

Par ailleurs, dès qu'une ICD est diagnostiquée, des mesures d'hygiène doivent être immédiatement mises en œuvre pour limiter la dissémination des spores dans l'environnement. Ces mesures incluent l'avertissement et la formation du personnel médical,

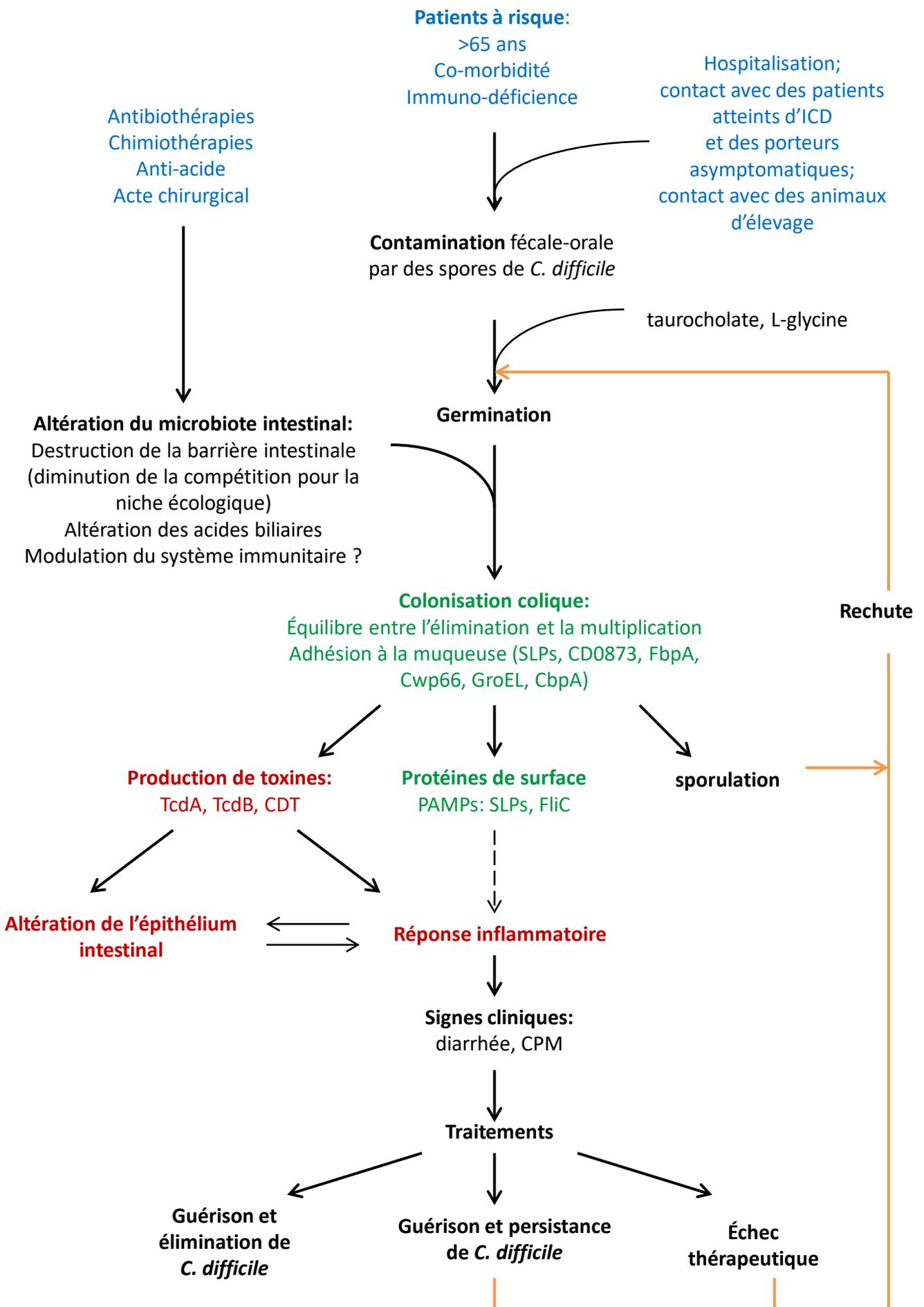


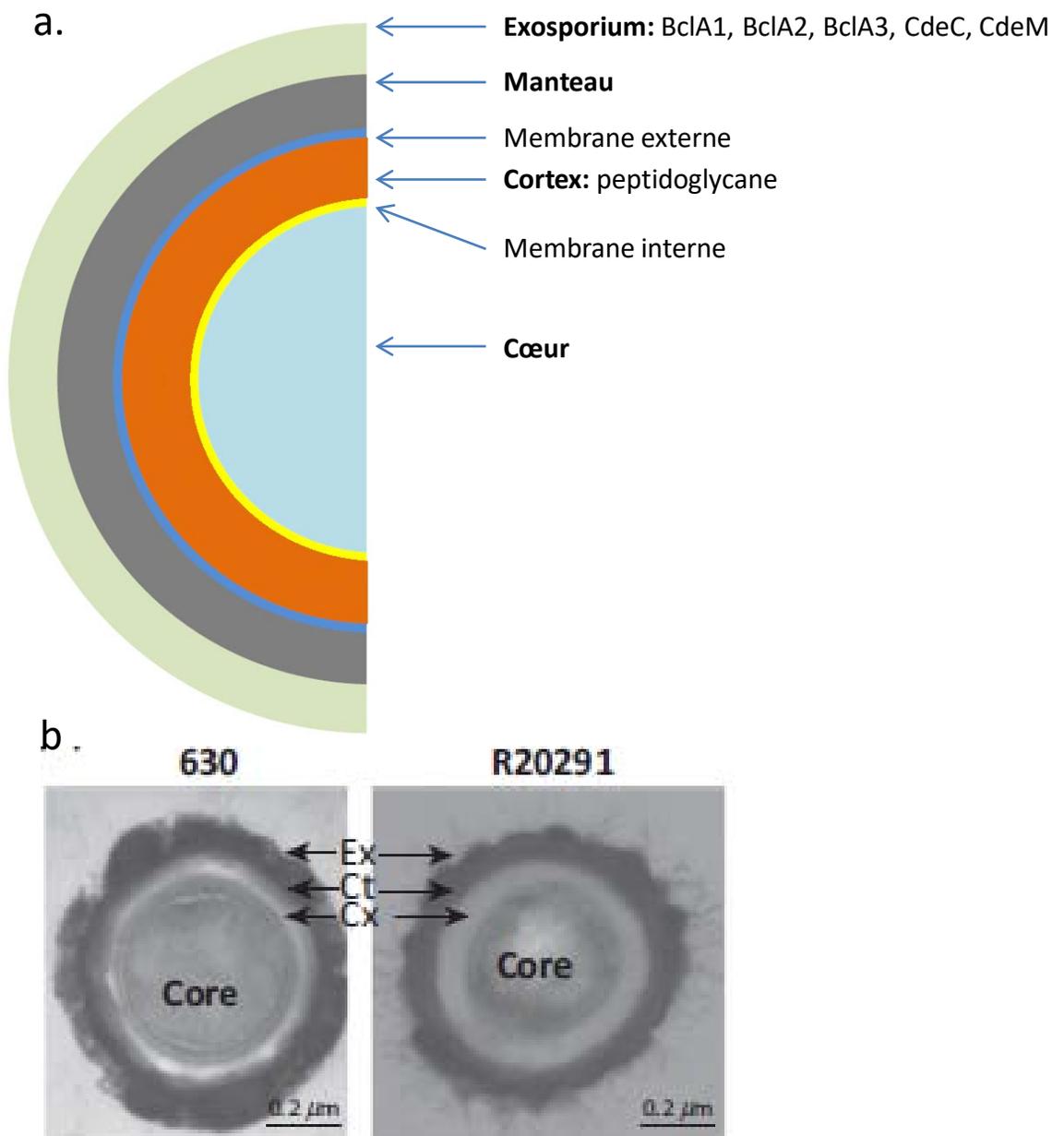
Figure 6. Physiopathologie des ICD.

des mesures d'isolement du patient, le maintien d'une bonne hygiène des mains, la décontamination du matériel et de l'environnement médical (Vonberg *et al.* 2008).

**Pour conclure, depuis le début des années 2000, l'incidence des ICD a augmenté. En outre, l'épidémiologie des ICD a extrêmement évolué avec notamment l'émergence de souches épidémiques hypervirulentes de ribotype 027 puis l'apparition de nouvelles souches cliniques d'autres ribotypes. *C. difficile* est ubiquitaire et bénéficie de nombreux réservoirs, patients symptomatiques ou asymptomatiques, jeunes enfants mais aussi de nombreux animaux d'élevage, de compagnie et l'environnement. Les facteurs de risques des ICD sont bien connus, l'âge avancé, les traitements antibiotiques, l'exposition à un environnement contaminé par des spores. La susceptibilité de l'hôte à développer une ICD dépend notamment de son microbiote intestinal et sa fonction de barrière mais aussi de sa capacité à développer une réponse immune efficace. Actuellement, le traitement des ICD repose sur l'emploi de différents antibiotiques en fonction de la sévérité de l'infection. Cependant, de nouvelles stratégies thérapeutiques voient le jour comme la transplantation fécale et l'immunothérapie essentiellement pour prévenir des récurrences.**

## **2. Facteurs de pathogénicité de *C. difficile* et physiopathologie**

Les ICD et le portage asymptomatique de *C. difficile* s'établissent le plus souvent à partir de la forme sporulée de la bactérie. Après germination des spores d'origine exogène ou endogène, *C. difficile* se multiplie et colonise l'intestin notamment suite à l'expression de facteurs de colonisation. Les souches toxigènes produisent alors les toxines responsables des manifestations cliniques (Figure 6). *C. difficile* peut persister chez l'hôte et être responsable d'une infection plus ou moins sévère et induire des rechutes. Les facteurs de pathogénicité de *C. difficile* sont impliqués dans la physiopathologie des infections, de la contamination par les spores à la virulence en passant par la colonisation de l'hôte et la persistance de la bactérie.



**Figure 7.** Structure de la spore. **a.** Représentation schématique de la spore de *C. difficile*. **b.** Image de microscopie électronique d'une section de spore de la souche 630 et R20291 de *C. difficile* (Ex. exosporium, Ct. Coat, Cx. Cortex). (Adapté de Paredes-Sabja D et al. Trends microbiol. 2014)



## 2.1. La spore

### *La spore et sa surface*

La spore est la forme quiescente de *C. difficile* majoritairement responsable de sa transmission et de sa dissémination dans l'environnement. En effet il a été montré qu'une souche mutante incapable de produire des spores (R20291 $\Delta$ *spo0A*) ne pouvait pas persister dans l'environnement ni se transmettre de souris à souris (Deakin *et al.* 2012). Par sa nature, cette forme confère à *C. difficile* une résistance à l'oxygène, au milieu acide et digestif de l'estomac, aux antibiotiques et pourrait être responsable de la persistance de la bactérie dans l'intestin de l'hôte (Lawley *et al.* 2009). La présence de *C. difficile* dans l'environnement est due à la grande stabilité des spores, pouvant atteindre plusieurs mois sur des surfaces inertes contaminées (Kramer *et al.* 2006).

La spore de *C. difficile* est constituée d'un cœur protégé principalement par trois couches successives, le cortex formé d'un peptidoglycane modifié, le manteau constitué principalement de protéines et la couche la plus externe, l'exosporium, constituée principalement de glycoprotéines (Paredes-Sabja *et al.* 2014). L'exosporium de *C. difficile* est plus ou moins dense en fonction des souches, il est constitué de protéines « collagen-like », BclA1, BclA2, BclA3 et de protéines riches en cystéine (protéines CdeC, CdeM, CdeA, CdeB) (Díaz-González *et al.* 2015). CdeC est indispensable à la formation de l'exosporium et à son ancrage au manteau (Barra-Carrasco *et al.* 2013). CdeM est une deuxième protéine intervenant dans la morphogenèse de l'exosporium (Díaz-González *et al.* 2015). Dans un modèle de souris monoxénique, le gène *cdeM* codant pour cette protéine est le plus exprimé pendant la sporulation de la souche 630 (Janoir *et al.* 2013). Les protéines CdeM et CdeC sont localisées à la surface de la spore et sont accessibles aux anticorps (Díaz-González *et al.* 2015) (Figure 7).

L'exosporium étant la couche la plus externe, elle est la plus susceptible d'interagir avec l'hôte et le système immunitaire. L'exosporium de la spore de *C. difficile* semble avoir un rôle dans la colonisation intestinale. Phetcharaburanin *et al.* ont montré dans des modèles souris et hamster que la dose suffisante pour infecter 50 % des animaux (ID50) était 100 fois plus importante pour une souche mutante pour la protéine de l'exosporium BclA1 que la souche sauvage (Phetcharaburanin *et al.* 2014). Paredes-Sabja *et al.* ont montré le rôle de l'exosporium dans l'adhésion aux cellules intestinales, en effet des spores dont l'exosporium

était altéré par sonication adhéraient moins aux cellules Caco-2 (Paredes-Sabja and Sarker 2012). Dans une autre étude, Paredes-Sabja *et al.* ont montré que les spores de *C. difficile* étaient capables de survivre dans des macrophages après phagocytose et que les spores avaient des effets cytotoxiques pour ces cellules. Ils ont observé une interaction entre la surface de la spore et la membrane du phagosome par microscopie électronique, suggérant un rôle de l'exosporium et de la spore dans l'échappement au système immunitaire inné (Paredes-Sabja *et al.* 2012).

### *La germination*

La contamination de l'hôte se fait par voie fécale-orale, les spores ingérées transitent par l'estomac jusque dans l'intestin. La germination de *C. difficile* se déroule dans le tractus intestinal notamment grâce à la présence d'acides biliaires particuliers (Koenigsnecht *et al.* 2015). Très tôt, il a été montré que les acides biliaires différaient dans leurs capacités à favoriser la germination et à influencer la croissance de *C. difficile in vitro* (Wilson 1983). Ainsi, le taurocholate, un acide biliaire primaire, et la L-glycine agissent comme co-germinants sans affecter la croissance de *C. difficile*. Ces co-germinants agissent sur la spore via le récepteur CspC (Francis *et al.* 2013). L'activation de CspC mène ainsi à la dégradation du cortex de la spore puis à l'hydratation du cœur et la reprise du métabolisme de *C. difficile* (Paredes-Sabja *et al.* 2014). Le chenodésoxycholate est un autre acide biliaire primaire, il inhibe la germination des spores de *C. difficile* et agit à la fois comme un inhibiteur compétitif du taurocholate et un suppresseur de la croissance (Sorg and Sonenshein 2009; Sorg and Sonenshein 2010). Le désoxycholate, un acide biliaire secondaire, favorise la germination mais limite nettement la croissance des formes végétatives (Wilson 1983; Sorg and Sonenshein 2008).

Le rôle potentiel du pool d'acides biliaires dans la colonisation par *C. difficile* fut soutenu par une étude *ex vivo* à partir d'extraits intestinaux issus de souris traitées avec la clindamycine et de souris non traitées (Giel *et al.* 2010). Cette étude a montré que les extraits intestinaux issus de souris traitées augmentaient la croissance de *C. difficile in vitro*. Ces extraits présentaient une plus forte proportion d'acides biliaires primaires que d'acides biliaires secondaires contrairement aux extraits issus de souris non traitées. Récemment dans une autre étude, des souris ont reçu différents antibiotiques afin de créer des environnements microbiens et

métaboliques distincts ; les contenus intestinaux ont ensuite été testés pour leur capacité à induire ou à inhiber la germination des spores de *C. difficile* et la croissance bactérienne *ex vivo* (Theriot *et al.* 2016). Après traitement antibiotique à large spectre (cefoperazone, clindamycine et vancomycine), la germination et la croissance de *C. difficile* étaient accrues dans les contenus intestinaux et, ceci était associé à une perte significative de la production d'acides biliaires secondaires (désoxycholate, lithocholate, ursodesoxycholate, hyodesoxycholate et  $\omega$ - muricholate). Ainsi, la transformation d'acides biliaires par le microbiote intestinal et son altération par les traitements antibiotiques modulent la sensibilité aux ICD (Abt *et al.* 2016).

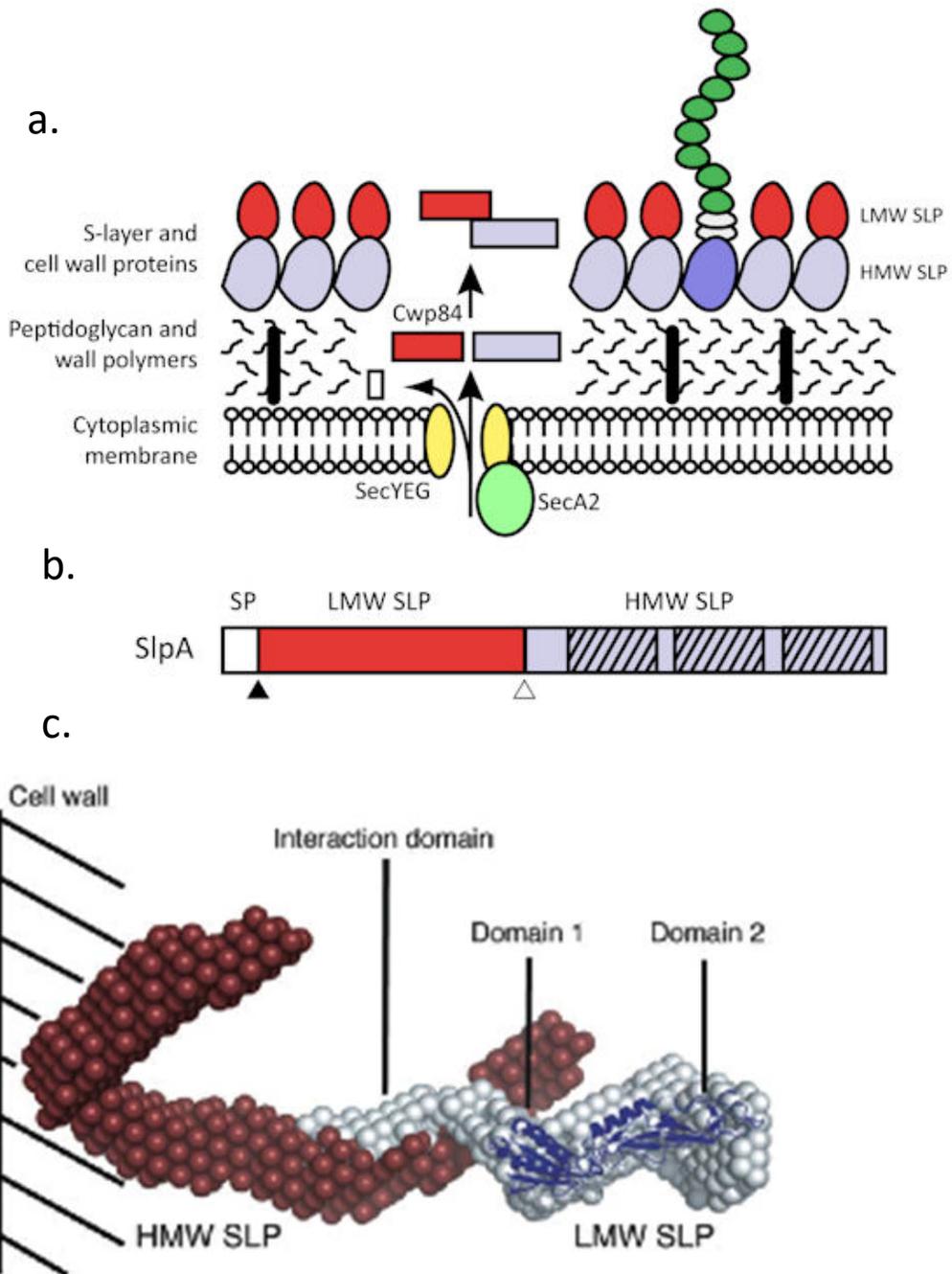
### *Sporulation et persistance de C. difficile chez l'hôte*

Lors du processus de colonisation de l'hôte, les formes végétatives de *C. difficile* peuvent entrer dans une phase de sporulation. Les signaux inducteurs de la sporulation sont associés à des stimuli environnementaux tels que la pénurie de nutriment, d'autres facteurs de stress et le quorum sensing. Lors de la sporulation, à un pôle de la cellule, un septum se forme divisant ainsi la cellule en deux compartiments de tailles différentes. Le plus petit est la pré-spore et deviendra ensuite la spore, l'autre compartiment est la cellule mère et prépare la pré-spore à l'entrée en dormance. Après maturation de la pré-spore, la spore est libérée par lyse de la cellule mère. La phase de sporulation est médiée par la phosphorylation du régulateur de transcription Spo0A (Underwood *et al.* 2009; Edwards and McBride 2014). L'activation de Spo0A entraîne l'activation séquentielle et compartimentée de facteurs  $\sigma^H$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ , et  $\sigma^K$  régulant ainsi un programme de transcription d'une douzaine de gènes impliqués dans la sporulation (Paredes-Sabja *et al.* 2014).

Bien que les mécanismes de persistance soient mal compris, la spore est la forme de dissémination de la bactérie et paraît responsable de la persistance de *C. difficile* chez l'hôte et serait source de rechute (Lawley *et al.* 2009; Crowther *et al.* 2014).

## **2.2. Les composants de surface de la forme végétative**

Sous sa forme végétative, *C. difficile* entre dans un cycle de multiplication et interagit avec la muqueuse intestinale. *C. difficile* possède à sa surface plusieurs composants capables d'interagir avec l'hôte, de se lier aux entérocytes et/ou à la matrice extracellulaire



**Figure 8.** La couche-S de *C. difficile*. **a.** Structure et formation de la couche-S suite au clivage du précurseur SlpA par la protéase Cwp84 (adapté de Kirk et al. Microb Biotechnol. 2017). **b.** Structure schématique de SlpA. **c.** Représentation 3D du complexe HMW-SLP/LMW-SLP (Fagan et al. Mol Microbiol. 2009)

SecA2, SecYEG: système de sécrétion Sec. SP: peptide signal. LMW SLP: low molecular weight surface layer protein. HMW SLP: High molecular weight surface layer protein.

(Janoir 2016). Une des caractéristiques de la paroi de *C. difficile* est d'être constituée d'un peptidoglycane fortement déacétylé. La couche-S est la structure la plus externe de *C. difficile*, elle est liée de manière non-covalente à la paroi par interaction avec des polysaccharides (PS) (Willing *et al.* 2015).

#### *La couche S et les protéines CWP (Cell Wall Proteins)*

De nombreuses bactéries possèdent à leur surface une couche cristalline appelée couche-S (SLPs pour Surface Layer Proteins). Elle est composée de protéines ou de glycoprotéines et couvre entièrement la cellule formant ainsi l'enveloppe la plus externe (Messner and Sleytr 1992). Cette structure apporte un maintien supplémentaire à la cellule. La couche-S joue un rôle de tamis moléculaire mais elle peut aussi intervenir dans l'adhésion cellulaire et participer au mécanisme d'échappement immunitaire. Toutes les souches de *C. difficile* possèdent une couche-S recouvrant toute la cellule. Cette couche est constituée de 2 feuillettes composés de deux protéines SLP distinctes. La couche externe est composée d'une protéine SLP de faible poids moléculaire LMW-SLP (pour low molecular weight-surface layer protein) et la couche interne d'une protéine glycosylée de haut poids moléculaire HMW-SLP (pour high molecular weight-surface layer protein). Ces deux sous-unités dérivent d'un précurseur commun SlpA codé par un gène unique *slpA* (Calabi *et al.* 2001). Ces deux protéines sont les plus abondantes protéines de surface et représentent un coût métabolique important pour *C. difficile* (Kirk *et al.* 2017a). Ces résultats suggèrent un rôle critique de la couche-S pour la bactérie (Kirk *et al.* 2017b). La protéine LMW-SLP (32 et 38 kDa) correspond à la partie N-terminale du précurseur, alors que la protéine HMW-SLP (42-48 kDa) correspond à la partie C-terminale du précurseur (Cerquetti *et al.* 2000). Après clivage du peptide signal lors de la translocation de la protéine SlpA à travers la membrane cellulaire par le système de sécrétion SecYEG/SecA2, SlpA est clivée par la protéase Cwp84 en deux fragments. Les deux sous-unités sont ensuite assemblées de manière non-covalente à la surface pour former un complexe HMW-SLP/LMW-SLP (H/L) constituant la couche-S (Fagan *et al.* 2009; Kirby *et al.* 2009; Dang *et al.* 2010) (Figure 8). Le domaine CWB2 de la protéine HMW-SLP lie le complexe H/L à la paroi par des interactions avec le polysaccharide de type II (Willing *et al.* 2015).

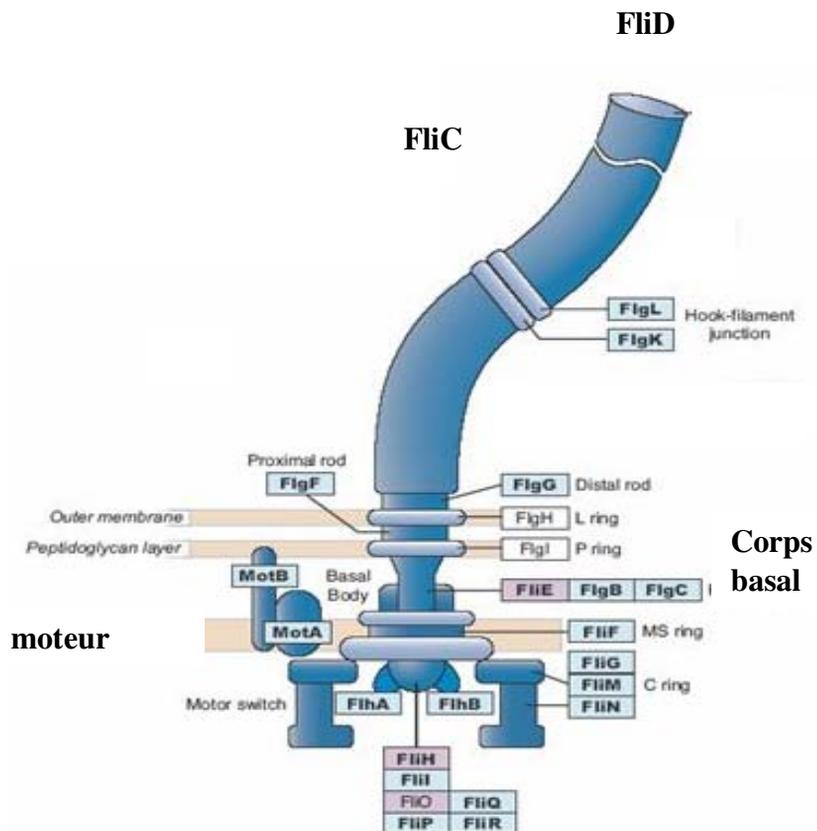
Le gène *slpA* fait partie d'un locus (S-layer locus) incluant en particulier le gène *secA2* ainsi que 11 gènes codant pour des protéines de paroi. Le gène *slpA* est hautement variable parmi les souches de *C. difficile*. Plus précisément, dans ce locus génétique, une cassette de 10kb

incluant les gènes *slpA*, *secA2*, *cwp2* et *cwp66*, présente 12 variants se comportant de manière indépendante du reste du génome (Dingle *et al.* 2013). La variabilité de SlpA est due à celle de la LMW-SLP alors que la HMW-SLP est relativement bien conservée entre les souches (Karjalainen *et al.* 2002). Récemment Lynch *et al.*, par une analyse phylogénétique des séquences de *slpA* de 26 ribotypes différents de *C. difficile*, ont démontré que les SLPs des ribotypes 027 et 078 présentaient des preuves d'évolution distinctes par rapport aux autres ribotypes (Lynch *et al.* 2017). Ces auteurs suggèrent que des marqueurs de sélection positive des SLPs pourraient être liés à l'émergence de souches hypervirulentes.

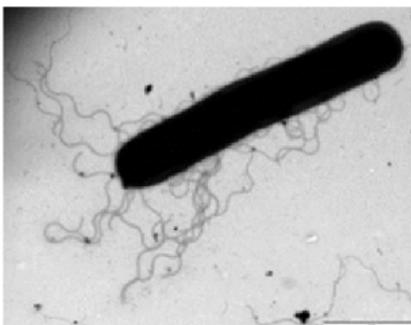
Le génome de *C. difficile* code pour vingt-huit paralogues de SlpA présentant tous trois copies du motif CWB2 en tandem et formant la famille des Cell-Wall Proteins (CWPs) (Fagan *et al.* 2011). Parmi les CWPs, la protéine Cwp66 a été la première caractérisée. C'est une protéine de 66kDa ayant des propriétés d'adhésine (Waligora *et al.* 2001). CwpV est la plus grosse protéine des CWPs, son expression est régulée par un switch génétique et elle est associée aux capacités d'agrégation de *C. difficile* (Emerson *et al.* 2009; Reynolds *et al.* 2011). Cwp84 est une cystéine protéase dont le principal substrat est le précurseur SlpA. Cependant Cwp84 dégrade aussi des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et le collagène de type IV (Janoir *et al.* 2007). Cwp84 est codée par le gène *cwp84* faisant partie du même locus que *slpA*. Cette protéase est hautement conservée parmi les souches de *C. difficile* (Savariau-Lacomme *et al.* 2003; Lemée *et al.* 2005). Une deuxième cystéine protéase, Cwp13 a été identifiée avec 63 % d'identité avec la protéase Cwp84. Cwp13 est capable de substituer Cwp84 en son absence dans la maturation de SlpA. De plus, Cwp13 jouerait un rôle dans le turnover de protéines mal repliées (de la Riva *et al.* 2011).

L'adhésion de *C. difficile* aux cellules épithéliales intestinales a été montrée *in vitro* à l'aide de plusieurs lignées cellulaires productrices ou non de mucus et *in vivo* dans différents modèles animaux ainsi que chez l'Homme à partir de biopsies de colon (Borriello *et al.* 1988; Lyra *et al.* 2012). L'adhésion de *C. difficile* à la muqueuse intestinale a aussi été montrée par son interaction avec certaines protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, le fibrinogène et différents types de collagène. Parmi les facteurs intervenant dans l'adhésion de *C. difficile*, on trouve les SLPs, LMW-SLP et HMW-SLP impliquées dans l'adhésion de *C. difficile* aux cellules épithéliales (Calabi *et al.* 2002). La HMW-SLP est capable de se lier et d'interagir avec la matrice extracellulaire et plus particulièrement le collagène de type I, la thrombospondine et la vitronectine. Cependant, l'adhésion n'était inhibée qu'à 50 % par des anticorps dirigés contre la LMW-SLP ou la HMW-SLP, suggérant que les capacités

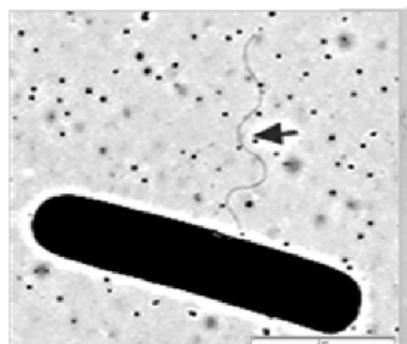
a.



b.



630 $\Delta$ erm



R20291

**Figure 9.** Le flagelle de *C. difficile*. **a.** Représentation de la structure du flagelle (adapté de Liu et Ochman 2007) . **b.** Image de microscopie électronique de la souche 630 $\Delta$ erm pluriflagellée et de la souche R20291 monoflagellée ( adapté de Baban et al. 2013)

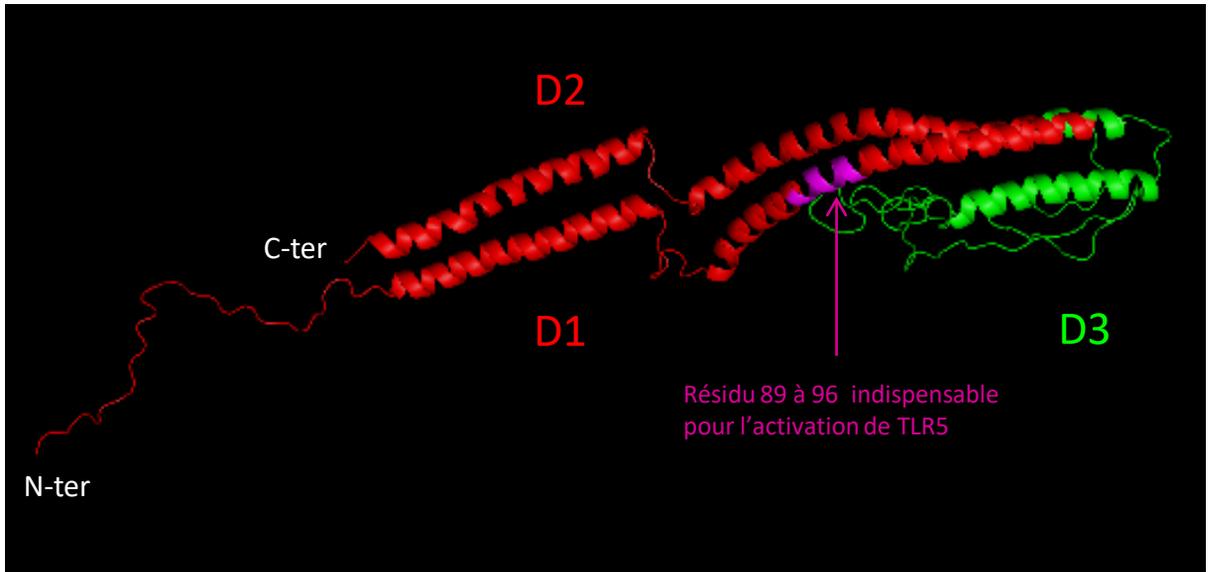
d'adhésion de *C. difficile* ne se limitent pas aux SLPs. En effet d'autres protéines ont des propriétés d'adhésine telles que Cwp66 (Waligora *et al.* 2001), FbpA (Hennequin *et al.* 2003), GroEl (Hennequin *et al.* 2001), CD0873 (Kovacs-Simon *et al.* 2014) et CbpA (Tulli *et al.* 2013). En plus de faciliter la colonisation, il est possible que les propriétés d'adhésion de *C. difficile* à la muqueuse intestinale puissent permettre de masquer certains déterminants antigéniques de surface afin d'échapper ainsi à la réponse immunitaire de l'hôte (Calabi *et al.* 2002). Des facteurs enzymatiques pourraient être aussi impliqués dans la colonisation. En effet bien que le rôle de l'activité protéolytique de Cwp84 n'ait pas encore été confirmé dans le processus de colonisation par *C. difficile*, Cwp84 pourrait faciliter le maintien de la bactérie dans le tissu épithélial après la rupture de l'épithélium par les toxines (Janoir 2016).

### *Les flagelles*

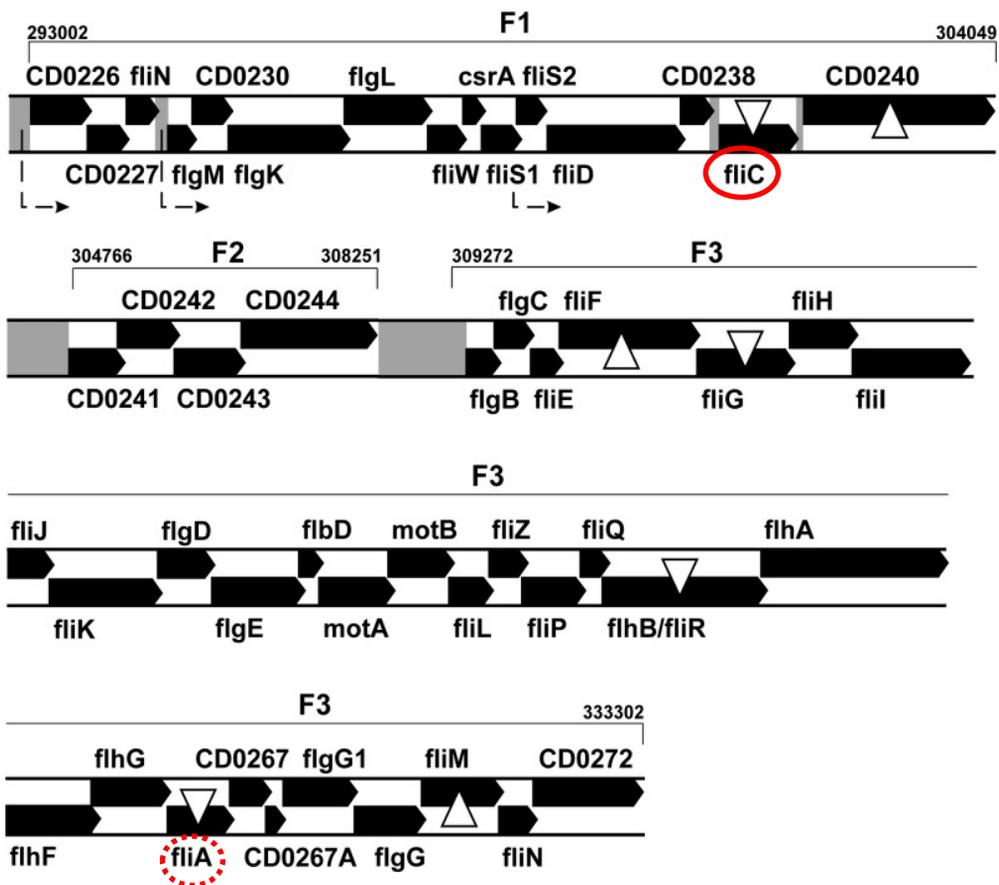
Toutes les souches de *C. difficile* ne sont pas flagellées, parmi les souches flagellées certaines sont monoflagellées alors que d'autres sont pluriflagellées. La base des flagelles est constituée d'une machinerie complexe s'apparentant au système de sécrétion de type III (Figure 9), elle comporte le système d'ancrage et le moteur du flagelle. Le corps flagellaire est constitué de la flagelline FliC et de la protéine de coiffe FliD qui termine la structure flagellaire (Liu and Ochman 2007; Erhardt *et al.* 2010). La protéine FliC est formée de 290 acides aminés et est codée par le gène *fliC* de 870 nucléotides. La structure de la flagelline est similaire à celle d'autres espèces dont la flagelline de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FLA-ST) considérée comme un modèle d'étude des flagellines. Elles sont composées de trois domaines, D1 et D2 composés des régions N- et C-terminales extrêmement conservées entre les espèces et un domaine D3 central hypervariable. En ce qui concerne FliC de *C. difficile*, les domaines D1 et D2 sont aussi extrêmement conservés parmi les différentes souches alors que le domaine central montre quelques variations (Tasteyre *et al.* 2000). Le domaine central D3 exposé à la surface du flagelle constitue la partie antigénique du filament flagellaire (Winstanley and Morgan 1997). Les régions N- et C-terminales interviennent dans la polymérisation de la flagelline et dans la formation du flagelle. Les domaines D1 et D2 contiennent des sites d'interactions avec le toll-like receptor 5 (TLR5) (Eaves-Pyles *et al.* 2001). Cependant pour FLA-ST, seuls les acides aminés 89 à 96 sont indispensables pour l'activation de TLR5 (Andersen-Nissen *et al.* 2005) (Figure 10). Ces acides aminés sont



a.



b.



**Figure 10.** La flagelline FliC et les opérons flagellaires. **a.** Représentation 3D de FliC. **b.** Les régions F1, F2 et F3 des opérons flagellaires (adapté de Aubry et al. Infect Immun. 2012)

masqués dans le filament flagellaire mais deviennent accessibles lorsque la flagelline est sous forme de monomère (Smith *et al.* 2003).

Les gènes codant pour les protéines flagellaires sont organisés en trois régions F1, F2 et F3 (Figure 10) (Aubry *et al.* 2012). L'expression de ces gènes est régulée de manière hiérarchique et la formation du flagelle est séquentielle. La première étape est médiée par l'opéron F3 exprimant les gènes codant pour les protéines de la base du flagelle (FliF, FliG, FliM, FlgB, MotA, MotB, etc...). Cette région est absente chez les souches de ribotype 078 et ces souches ne sont donc pas flagellées. Dès que tous les produits de la région F3 sont correctement assemblés, l'opéron F3 induit l'expression de la région F1 par l'intermédiaire du facteur sigma FliA (aussi nommée SigD) (Anderson *et al.* 2010; Aubry *et al.* 2012; El Meouche *et al.* 2013). L'expression de l'opéron F3 est soumise à la régulation par un riboswitch sous control de C-di-GMP. Récemment, un « switch » flagellaire ON/OFF additionnel a été identifié en amont de l'opéron F3 régulant ainsi la formation des flagelles. L'inversion de ce « switch » flagellaire semble être induit par l'action de la tyrosine recombinase RecV (Anjuwon-Foster and Tamayo 2017). La région F1 est présente chez toutes les souches de *C. difficile* et code pour les gènes du corps flagellaire notamment FliC et FliD. La région F2 code pour des gènes de glycosylation du flagelle (Twine *et al.* 2009). La glycosylation des flagelles est variable entre les souches de *C. difficile* et semble jouer un rôle structural dans l'assemblage du flagelle. En effet l'inactivation de la glycosylation résulte en la présence de filaments flagellaires tronqués et en la perte de la mobilité (Twine *et al.* 2009; Faulds-Pain *et al.* 2014). En outre, la régulation flagellaire est intimement liée avec l'expression des toxines, témoignant d'un lien entre la virulence de *C. difficile* et les flagelles (Aubry *et al.* 2012; El Meouche *et al.* 2013).

En plus de la structure du flagelle, FliC intervient dans la régulation de gènes pléiotropiques. Une étude transcriptomique comparant un mutant *fliC* de la souche 027 R20921 à la souche sauvage a montré que FliC intervenait dans la régulation positive des gènes impliqués dans la mobilité, les systèmes de transport membranaire, le métabolisme du carbone, les facteurs de virulence et la sporulation. De plus, une régulation positive de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la fermentation, le métabolisme, le stress et la résistance aux antibiotiques était également apparente. Ces résultats ont été confirmés par restauration du phénotype sauvage après complémentation du gène *fliC* (Barketi-Klai *et al.* 2014).

Pour certains pathogènes, l'expression des gènes flagellaires dépend des conditions environnementales (Soutourina and Bertin 2003; Derman *et al.* 2015). En ce qui concerne *C.*

*difficile*, la souche 630 exprime les gènes flagellaires *in vitro* essentiellement en phase exponentielle de croissance (Saujet *et al.* 2011). *In vivo*, différents résultats d'expression en fonction du modèle ont été obtenus : dans un modèle de souris monoxénique aucune modulation d'expression n'était observée entre 8h et 38h après l'administration par voie orale de *C. difficile* (Janoir *et al.* 2013), alors que dans le modèle d'anse ligaturée de porc une étude suggère que l'expression des gènes flagellaires est précoce dans le processus de colonisation (Scaria *et al.* 2011).

Pour la majorité des bactéries entéropathogènes, flagelles et motilité sont reconnus comme des facteurs de colonisation essentiels (Duan *et al.* 2013). Les flagelles de nombreuses bactéries responsables d'infection des muqueuses interviennent dans la formation et le développement de structures multicellulaires comme par exemple les biofilms (Sauer *et al.* 2002; Kalmokoff *et al.* 2006; Barken *et al.* 2008; Kim *et al.* 2008; Yildiz and Visick 2009). Plusieurs études ont montré l'importance des flagelles dans l'adhésion au tissu intestinal et leur participation à la virulence de *C. difficile*. Tasteyre *et al.* ont montré que des souches naturellement mobiles adhéraient d'avantage aux parois caecales des souris monoxéniques que des souches naturellement non flagellées, cependant cette différence d'adhésion ne se traduisait pas par une différence au niveau de la clairance bactérienne dans les fèces (Tasteyre *et al.* 2001). Plus récemment, après construction de mutants isogéniques pour les gènes *fliC* et *fliD* dans différentes souches de *C. difficile*, il a été montré que le rôle de ces protéines dans la virulence et la colonisation par *C. difficile* semblait dépendre du fond génétique de la souche. En effet, des mutants isogéniques de la souche 630 $\Delta$ erm pour les gènes *fliC* et *fliD* ont montré une adhésion plus forte aux cellules Caco2 *in vitro* (Dingle *et al.* 2011). Cependant *in vivo*, aucune différence de colonisation n'était observée entre le mutant et la souche sauvage quel que soit le modèle animal utilisé, modèle hamster, souris à flore humaine, souris monoxénique ou souris dixénique (Dingle *et al.* 2011; Baban *et al.* 2013; Faulds-Pain *et al.* 2014). Ceci suggère que pour cette souche, ces protéines modifient les capacités d'adhésion aux cellules épithéliales de la bactérie mais n'interviennent pas dans la colonisation. En revanche, en ce qui concerne la souche 027 R20291, des mutants *fliC* (R20291-*fliC*430s::CT) et *fliD* (R20291-*fliD*121s::CT) ont montré une adhésion significativement plus faible aux cellules Caco2 comparée aux souches sauvages. Dans un modèle de souris dixénique le mutant *fliC*-R20291 a montré une capacité colonisatrice moindre par rapport à la souche sauvage (Baban *et al.* 2013). Par ailleurs, un mutant R20291 flagellé mais non mobile (R20291-*flgE*311s::CT) adhérait plus aux cellules Caco2 que le mutant non flagellé *fliC*

(Baban *et al.* 2013). Ceci suggère que les protéines du flagelle participent à l'adhésion aux cellules épithéliales et à la colonisation. Une étude transcriptomique *in vivo* du mutant *fliC*-R20291 a révélé que cette mutation pouvait impacter négativement l'expression d'autres gènes impliqués dans l'interaction avec l'hôte tel que le gène codant pour la lipoprotéine CD0873 (Barketi-Klai *et al.* 2014). L'ensemble de ces résultats montre l'importance du flagelle et de la protéine FliC dans l'adhésion et la colonisation chez une souche PCR-ribotype 027. Les différences observées entre la souche 630 et la souche R20291 ne sont pas encore expliquées. Cependant, il est important de noter que la souche 630 est pluriflagellée et plus mobile que la souche R20291 monoflagellée. De plus il est possible que ces deux souches présentent des différences de glycosylation à la surface de *C. difficile* et au niveau du flagelle pouvant jouer un rôle dans la colonisation (Twine *et al.* 2009; Faulds-Pain *et al.* 2014).

L'expression des gènes flagellaires impacte significativement la virulence de *C. difficile*. Dans l'étude de Dingle *et al.*, les mutants *fliC* et *fliD* issus de la souche 630 $\Delta$ erm ont une virulence accrue par rapport à la souche parentale caractérisée par une production de toxines et une cytotoxicité plus importante *in vitro* (Dingle *et al.* 2011). Cette toxicité accrue par mutation du gène *fliC* dans la souche 630 a été confirmée dans une autre étude et est associée à une augmentation d'expression des gènes *tcdA* *tcdB* et *tcdR* (Aubry *et al.* 2012). Cependant, Baban *et al.* n'ont pas observé de toxicité accrue pour le mutant *fliC*-R20291 (Baban *et al.* 2013). La relation entre l'expression des gènes flagellaires et la production des toxines peut être expliquée par la régulation du facteur sigma FliA (ou SigD) soumis à son tour à une régulation complexe (Soutourina *et al.* 2013; Anjuwon-Foster and Tamayo 2017). FliA régule positivement l'expression de *tcdR* qui régule à son tour l'expression de *tcdA* et *tcdB*.

### *Les lipoprotéines*

Les lipoprotéines bactériennes sont des protéines de surface ancrées dans la membrane cellulaire après un processus de lipidation post-traductionnel. Les lipoprotéines jouent un rôle dans le transport transmembranaire, la sporulation, la germination et l'adhésion (Kovacs-Simon *et al.* 2011). Une étude du lipoprotéome de *C. difficile* a permis de confirmer la lipidation de plus de 50 protéines. La mutation de la « lipoprotein diacylglycerol transferase » (*lgt*) impliquée dans la lipidation des protéines et de deux « lipoprotein signal peptidases »

(lspA et lspA2) impliquées dans la formation des lipoprotéines a montré le rôle des lipoprotéines dans la sporulation de *C. difficile* (Charlton *et al.* 2015). Par ailleurs, Kovacs-Simon *et al.* ont identifié une nouvelle lipoprotéine, la protéine CD0873, décrite par bio-informatique comme un possible ABC transporteur de sucre. De plus, cette lipoprotéine CD0873 a montré *in vitro* des fonctions d'adhésion aux cellules Caco2 (Kovacs-Simon *et al.* 2014).

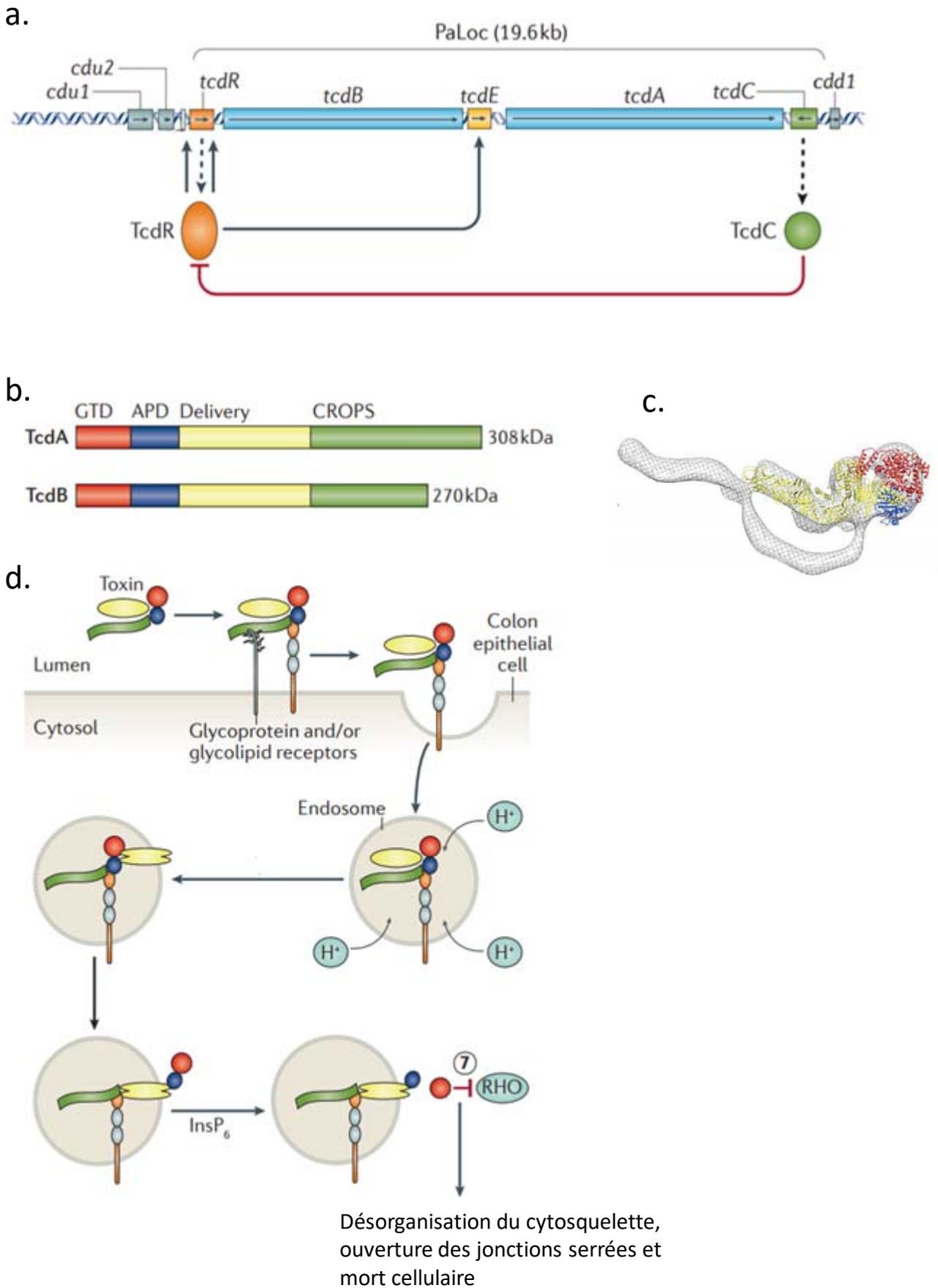
#### *Autres composants de surface de C. difficile*

D'autres protéines de surface ont été décrites comme adhésines : une protéine de liaison à la fibronectine FbpA (fibronectin binding protein) (Hennequin *et al.* 2003), la protéine de choc thermique GroEL (Hennequin *et al.* 2001), une protéine de liaison au collagène CbpA (collagen binding protein) (Tulli *et al.* 2013) dont les propriétés adhésives semblent être modulées par la métalloprotéase ZMP1 (Hensbergen *et al.* 2014; Hensbergen *et al.* 2015).

*C. difficile* possède à sa surface trois types de polysaccharides (PS) PS-I, PSII et PSIII (Ganeshapillai *et al.* 2008). PS-I est composé d'unités pentaglycosyl phosphate ramifiées alors que PS-II est composé d'unités hexaglycosyl phosphate (Ganeshapillai *et al.* 2008; Reid *et al.* 2012). PS-II contrairement à PSI est commun et est conservé à travers toutes les souches de *C. difficile* (Ganeshapillai *et al.* 2008; Bertolo *et al.* 2012). PSIII est un polymère glycosyl-phosphate lié par liaison lipidique à la membrane (Reid *et al.* 2012), il a été décrit comme un membre de la famille des acides lipotéichoïques (LTA) (Percy and Gründling 2014).

### **2.3. Les toxines**

Les toxines de *C. difficile* sont les facteurs de virulence majeurs de la bactérie et sont responsables des lésions tissulaires et des signes cliniques. Seules les souches toxigènes sont pathogènes et responsables d'ICD (Voth and Ballard 2005). *C. difficile* peut produire trois toxines différentes, deux toxines de haut poids moléculaire TcdA et TcdB et la toxine binaire CDT. Cependant, l'importance relative de chacune des toxines est encore débattue, pour certains TcdB est essentielle pour la virulence de *C. difficile* (Lyras *et al.* 2009; Carter *et al.* 2015) alors que pour d'autres les deux toxines TcdA et TcdB participent à la virulence (Kuehne *et al.* 2010; Kuehne *et al.* 2014). Bien que des souches pathogènes TcdA-TcdB+ aient été fréquemment isolées chez des patients, les souches TcdA+ TcdB- restent



**Figure 11.** Les toxines TcdA et TcdB. **a.** Organisation génétique du PaLoc. **b.** Domaines structuraux de TcdA et TcdB (GTD: glucosyl transferase domain; APD: Autoproteolytic Delivery domain; CROPS: combined repetitive oligopeptides). **c.** Représentation 3D de TcdA. **d.** Mode d'action de TcdA ou TcdB sur les cellules épithéliales (adapté de Smits et al. Nat Rev Dis Primers, 2016)

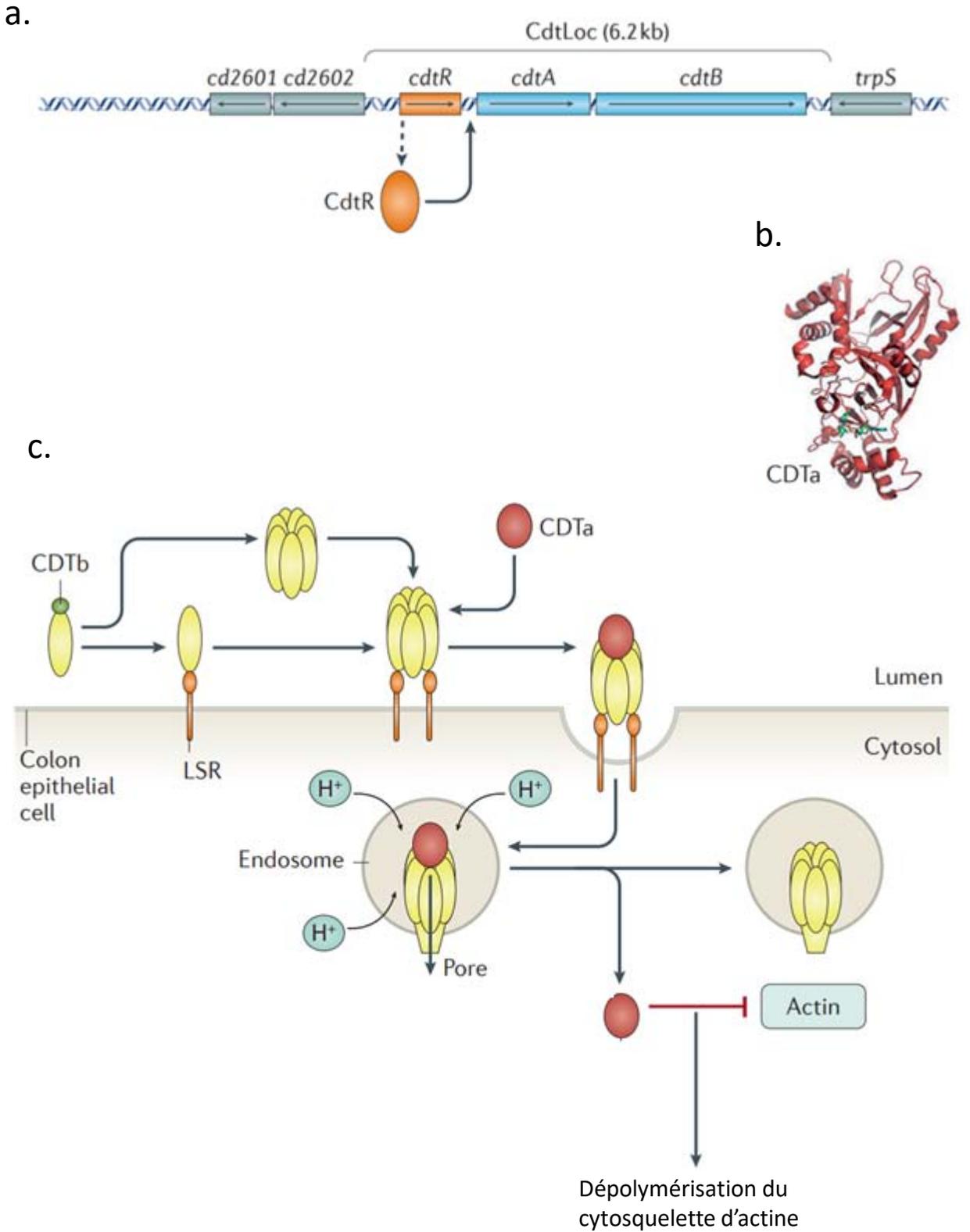
rars. De plus, des souches TcdA- TcdB- et CDT+ ont été isolées chez certains patients et pourraient aussi être responsables d'ICD chez l'Homme (Eckert *et al.* 2015).

### *Les toxines TcdA et TcdB*

Les toxines TcdA et TcdB sont relarguées dans le milieu extérieur pendant la phase stationnaire de croissance (Ketley *et al.* 1984), et leur expression est soumise à une régulation complexe (Martin-Verstraete *et al.* 2016). Les protéines TcdA et TcdB sont codées respectivement par les gènes *tcdA* (8133 pb) et *tcdB* (7098pb) sous la régulation de TcdR et TcdC (Dupuy *et al.* 2008), situés sur le locus de pathogénicité PaLoc de 19.6 kb (Voth and Ballard 2005; Carter *et al.* 2012; Monot *et al.* 2015). Ce sont deux protéines de haut poids moléculaire, 308 kDa pour TcdA et 269,9 kDa pour TcdB. Ces toxines ont une structure en domaines ABCD (A pour activity, B pour binding, C pour cutting, D pour delivery) (Jank and Aktories 2008; Davies *et al.* 2011). Le domaine B, qui permet la liaison aux récepteurs sur les cellules épithéliales intestinales est constitué de séquences polypeptidiques répétées appelées CROPs (combined repetitive oligopeptides) variables et divergentes entre TcdA et TcdB (Ho *et al.* 2005) (Figure 11).

TcdA et TcdB interagissent avec différents récepteurs, TcdA semble se lier à une glycoprotéine (gp96) (Na *et al.* 2008) alors que trois récepteurs sont actuellement décrits pour TcdB, le « chondroïtin sulfate proteoglycan 4 » (Yuan *et al.* 2015), le « poliovirus receptor-like 3 » (PVRL3) (LaFrance *et al.* 2015) et les "Frizzled proteins FZD1, FZD2, FZD7 (Tao *et al.* 2016).

Après liaison de la toxine aux récepteurs, celle-ci est alors internalisée par endocytose. Le domaine D est impliqué dans la translocation des toxines au niveau du cytoplasme. Le domaine C a une activité cystéine protéase et est responsable du clivage auto-catalytique de la toxine activant ainsi le domaine A. Ce domaine A (en position N-terminale), transloqué dans le cytosol, a une activité glycosyltransférase ciblant les protéines Rho. Cette glycosylation des Rho GTPases entraîne leur inactivation et donc la désorganisation du cytosquelette d'actine, la rupture des jonctions serrées et la mort cellulaire (Nusrat *et al.* 2001; Smits *et al.* 2016). La destruction de l'épithélium intestinal est à l'origine d'une réaction inflammatoire plus ou moins intense et des symptômes (Figure 11 d).



**Figure 12.** La toxine binaire CDT. **a.** Organisation génétique du *cdtLoc*. **b.** Représentation 3D de CDTa. **c.** Action de CDTa et CDTb sur les cellules épithéliales. LSR: lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (adapté de Smits et al. Nat Rev Dis Primers, 2016)



### *La toxine binaire CDT*

Certaines souches de *C. difficile* (20 %) produisent une troisième toxine, la toxine binaire ou CDT (*Clostridium difficile* transferase). Cette toxine est produite par toutes les souches hypervirulentes BI/NAP1/027 (Gerding *et al.* 2014). Elle est composée de deux sous-unités, CdtA qui correspond au domaine enzymatique et qui possède des propriétés ADP-ribosyl-transférase spécifique de l'actine (Popoff *et al.* 1988) et CdtB qui correspond au composant de liaison aux récepteurs sur les cellules intestinales. Ces deux sous-unités sont codées par les gènes *cdtA* et *cdtB* constituant avec un gène régulateur *cdtR* le CdtLoc (Carter *et al.* 2007; Smits *et al.* 2016) à distance du PaLoc (Figure 12).

La sous-unité CdtB se lie à son récepteur LSR (Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor) et plus particulièrement au domaine « Ig-like ». Cette interaction induit un regroupement des LSR à des radeaux lipidiques (Papatheodorou *et al.* 2011). Par la suite, la sous-unité CdtA est transloquée dans la cellule et catalyse l'ADP-ribosylation de l'actine qui ne se polymérise plus d'où la destruction du cytosquelette et éventuellement la mort de la cellule (Figure 12). La toxine binaire induit aussi la formation de protusions de microtubules et la redistribution de la fibronectine (Schwan *et al.* 2014). Cette toxine pourrait être responsable en partie de l'hypervirulence des souches BI/NAP1/027 (Gerding *et al.* 2014).

**Pour conclure, la colonisation par *C. difficile* est facilitée par la perturbation du microbiote intestinal et plus particulièrement par la destruction de son effet barrière et par la modification des acides biliaires. Elle se déroule dans les parties basses du tractus intestinal notamment en raison des conditions d'anaérobiose. L'étape de colonisation est définie par le maintien d'un équilibre entre la clairance et le développement de *C. difficile* dans le colon et implique le rôle de certains facteurs dans l'adhésion à l'épithélium intestinal, la multiplication bactérienne, et la persistance de la bactérie chez l'hôte (Lawley *et al.* 2009; Janoir 2016). La virulence de *C. difficile* se manifeste par l'expression des toxines induisant la rupture de la barrière épithéliale et une importante réponse inflammatoire.**

### **3. *C. difficile* et immunité muqueuse**

Dans un premier temps *C. difficile* induit une réponse inflammatoire intestinale suite à l'action des toxines sur l'épithélium. Cette réponse inflammatoire est accentuée dans un deuxième temps par la perte de l'intégrité du tissu épithélial causant une augmentation de la perméabilité transmembranaire. Puis les toxines et les autres composants pro-inflammatoires de *C. difficile* interagissent avec les cellules de l'immunité innée et active la réaction inflammatoire. La sévérité et la durée de l'infection sont directement corrélées au niveau de la réponse inflammatoire induite (El Feghaly *et al.* 2013). La réponse immunitaire innée initiale en réponse à *C. difficile* entraîne l'induction de la réponse immunitaire adaptative caractérisée par la production d'immunoglobulines (IgM, IgA et IgG) spécifiques ainsi que par une réponse immunitaire mémoire. Les anticorps produits en réponse à *C. difficile* sont spécifiquement dirigés contre les toxines et les composants de surface. Le niveau de cette réponse apparaît corrélé avec la protection et la prévention des ICD (Péchiné and Collignon 2016).

#### **3.1. *C. difficile* et réponse immunitaire innée**

##### *Rôle des différents acteurs de l'immunité innée dans les ICD*

L'inflammation du tissu intestinal est responsable des signes cliniques des ICD. Chez l'Homme le degré de la réponse inflammatoire est directement corrélé à la sévérité de l'infection (El Feghaly *et al.* 2013). Cette réponse inflammatoire est la première réponse immunitaire induite et est essentielle dans la lutte contre les infections. Dans le modèle souris d'ICD, de nombreuses études ont montré qu'une déficience de la réponse innée entraînait une sensibilité accrue aux ICD. Ainsi des souris knockout (KO) pour différents facteurs de l'immunité innée tels que "myeloid differentiation factor 88" (MyD88), "nucleotide-binding oligomerization domain 1" (NOD1) développaient une infection plus sévère (Lawley *et al.* 2009; Hasegawa *et al.* 2011; Jarchum *et al.* 2012; Hasegawa *et al.* 2012). Ces études soulignent l'importance d'une réponse inflammatoire dans la protection contre *C. difficile*.

Cependant, si cette réponse est exacerbée, celle-ci devient délétère. L'expression de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'interleukine 10 (IL-10), joue un rôle important dans la

régulation négative de la réponse inflammatoire. Des souris IL-10 KO sont significativement plus sensibles à l'infection par *C. difficile* et développent une inflammation du colon plus importante que les souris sauvages, avec augmentation de la production d'interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Kim *et al.* 2014). Inversement, l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-23 est associée à l'augmentation de la sévérité des ICD (Buonomo *et al.* 2013). Des souris IL-23 KO montrent une réduction significative de la morbidité et mortalité après challenge par *C. difficile*. De manière intéressante, les toxines ne suffisent pas à induire la production d'IL-23 par les cellules dendritiques, et nécessite l'association de composant bactériens pro-inflammatoires décrits comme des « pathogen associated molecular patterns » (PAMPs), ou des « host-derived damage-associated molecular patterns » (DAMPs) (Cowardin *et al.* 2015). De plus, il a été montré que l'IL-23 dans le contexte d'une ICD chez la souris entraînait le recrutement de neutrophiles dans le colon par l'expression de chimiokines (McDermott *et al.* 2016). L'ensemble de ces résultats suggère que l'IL-23 interviendrait dans un deuxième temps dans l'exacerbation de la réponse inflammatoire induite par *C. difficile*.

Récemment, Abt *et al.* ont déterminé le rôle central des cellules lymphoïdes innées (CLIs). Les CLIs répondent à l'IL-1 $\beta$ , IL-12 et l'IL-23 produites lors des ICD (Kim *et al.* 2006; Sadighi Akha *et al.* 2013; Cowardin *et al.* 2015). Une fois activées, les CLIs produisent notamment l'IL-22, IL-17, l'IFN- $\gamma$  et le « tumor necrosis factor- $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ). Ces dernières cytokines permettent l'activation des polynucléaires neutrophiles et des macrophages. Des souris déficientes en CLIs, en lymphocytes T et en lymphocytes B (RAg1<sup>-/-</sup> Il2rg<sup>-/-</sup>) présentent une plus grande mortalité après infection par *C. difficile* que les souris sauvages et les souris déficientes uniquement en lymphocytes T et lymphocytes B (Abt *et al.* 2015). Abt *et al.* ont montré que les CLIs en produisant activement l'IFN- $\gamma$  et l'IL-22 intervenaient dans la protection contre *C. difficile*.

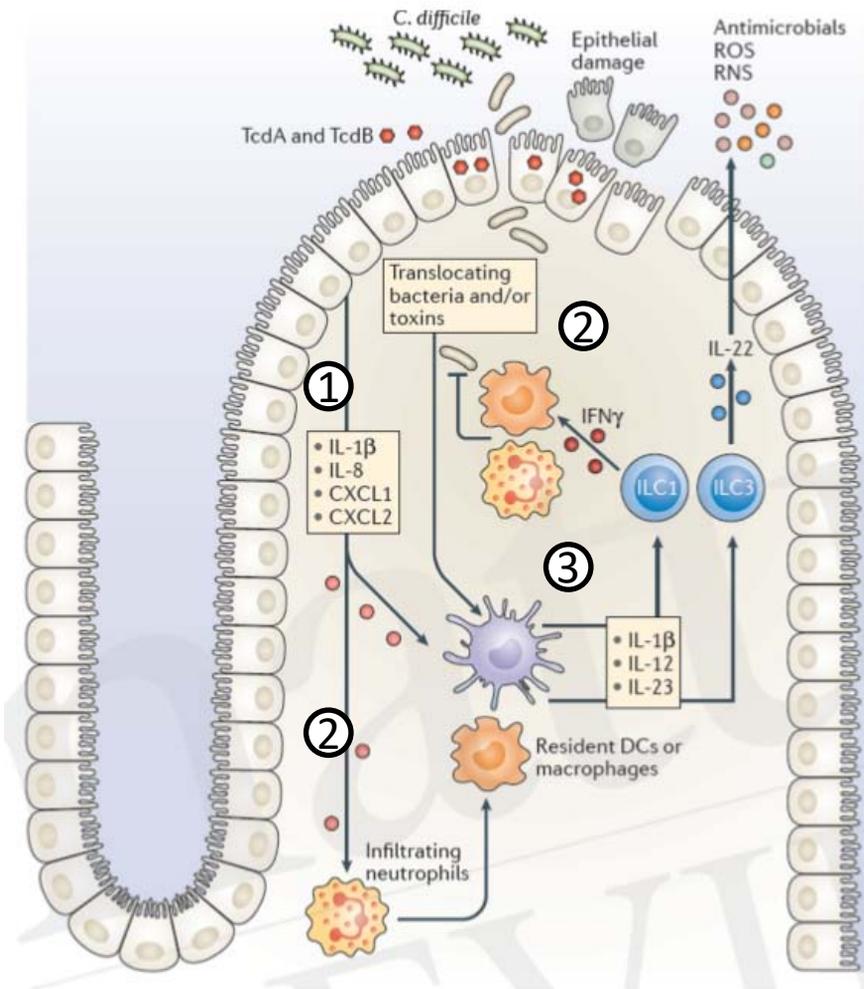
Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse inflammatoire associée à *C. difficile*, ces cellules sont abondantes chez les patients atteints d'ICD (Darkoh *et al.* 2014). La déplétion des polynucléaires neutrophiles chez des souris entraîne une augmentation de la mortalité post-challenge (Jarchum *et al.* 2012). Les neutrophiles sont notamment recrutés par l'IL-23 et le « granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) augmentant la production de chimiokines attractrices de neutrophiles CXCL1 et CXCL2 (McDermott *et al.* 2014; McDermott *et al.* 2016). La protection induite par les polynucléaires neutrophiles peut s'expliquer par la libération de « reactive oxygen species » (ROS) toxiques pour les bactéries ainsi que d' $\alpha$ -défensine 5 qui

entraîne une inactivation de TcdB (Gieseemann *et al.* 2008). Par ailleurs, il a été montré que cette défensine pouvait être toxique pour *C. difficile* (Furci *et al.* 2015). Cependant, certaines souches de *C. difficile* sont résistantes au stress oxydatif. L'action des neutrophiles peut être inefficace pour l'hôte voir délétère puisque les ROS sont aussi toxiques pour les cellules de l'hôte (Girinathan *et al.* 2014).

### *Réponse innée liée aux toxines*

L'action des toxines sur les cellules épithéliales intestinales représente la première étape de la réaction inflammatoire. TcdA et TcdB induisent la production de cytokines et chimiokines par les cellules épithéliales de manière indépendante de leur activité glycosyl-transférase. Les deux toxines sont capables d'induire l'activation des facteurs de transcription « nuclear factor  $\kappa$ B » (NF- $\kappa$ B) et « activator protein 1 » (AP-1) par la voie des mitogen-activated protein (MAP) kinases induisant ainsi la production d'IL-8, CXCL1, CXCL2, CCL2 conduisant au recrutement et à l'activation des macrophages, des mastocytes et des polynucléaires neutrophiles. Par ailleurs, la production de ROS induite par les toxines, mais de manière indépendante de leur activité glycosyl-transférase, peut aussi induire la production d'IL-8 par les cellules épithéliales. Cette production de ROS exacerbe potentiellement l'effet cytotoxique des toxines.

L'inactivation des protéines Rho due à l'activité glycosyl transférase des toxines dans les cellules épithéliales participe à la formation et l'activation de l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multiprotéique constitué de protéines senseurs telles que les « nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing proteins » (NLRPs), des protéines adaptatrices telle que la « apoptosis-associated speck-like protein containing (ASC) caspase-activation and recruitment domain » (CARD) et des protéines effectrices comme les pro-caspases qui, activées en caspases, maturent les pro-IL1 $\beta$  et pro-IL-18 en formes actives (Xu *et al.* 2014). L'IL-1 $\beta$  contribue à l'activation des lymphocytes et au recrutement des leucocytes au niveau du site inflammatoire. L'IL-18 contribue à l'activation de la voie T-helper 1 de l'immunité adaptative (Th1). Il a été montré *in vivo*, une diminution significative de l'inflammation chez des souris ASC KO par rapport aux souris sauvages, confirmant l'importance de l'activation de l'inflammasome par les toxines dans la physiopathologie des ICD (Ng *et al.* 2010).



**Figure 13.** Réponse inflammatoire liée aux toxines. 1) Production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. 2) Action cytotoxique des toxines et rupture de la barrière épithéliale et activation des cellules de l'immunité innée par les toxines. Recrutement de polynucléaires neutrophiles, macrophages et autres cellules de l'immunité innée. 3) Recrutement et activation des cellules lymphoïdes innées (ILC). (adapté de Abt et al. Nat Rev Microbiol. 2016)

Après rupture de la barrière épithéliale, TcdA et TcdB peuvent aussi stimuler les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques participant dans un deuxième temps à la prolongation de la réponse inflammatoire.

L'exposition de macrophages aux toxines induit une forte production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  (Rocha *et al.* 1998; Warny *et al.* 2000). Ng *et al.* ont montré *in vitro* que TcdA et TcdB pouvaient aussi induire la formation d'un inflammasome dans des monocytes humains et des macrophages de souris, entraînant ainsi la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Ng *et al.* 2010).

Les mastocytes semblent jouer un rôle central dans la réponse inflammatoire induite par *C. difficile*, Wershil *et al.* ont observé une protection contre l'inflammation induite par TcdA chez des souris déficientes en mastocyte. Cette protection était inhibée en présence de mastocytes (Wershil *et al.* 1998). L'activation des mastocytes par TcdA et TcdB entraîne la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et CCL3 ainsi que la dégranulation et le relargage par les mastocytes de nombreuses enzymes actives sur le tissu conjonctif tels que la tryptase et des médiateurs inflammatoires comme l'histamine (Meyer *et al.* 2007).

Les cellules dendritiques peuvent aussi être activées par les toxines. Lee *et al.* ont montré que des cellules dendritiques immatures dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) exposées à TcdA entraînaient une activation de la voie p38 MAPK, la maturation de ces cellules et la production de chimiokines attractrices de neutrophiles CXCL2 (Lee *et al.* 2009). Une autre étude, a montré que l'exposition de BMDCs à une souche de *C. difficile* toxigène entraînait une production significative d'IL-12 et d'IL-1 $\beta$ . Ces cellules dendritiques exposées à *C. difficile* induisent la différenciation des lymphocytes T en Th1 et Th17 (Jafari *et al.* 2013).

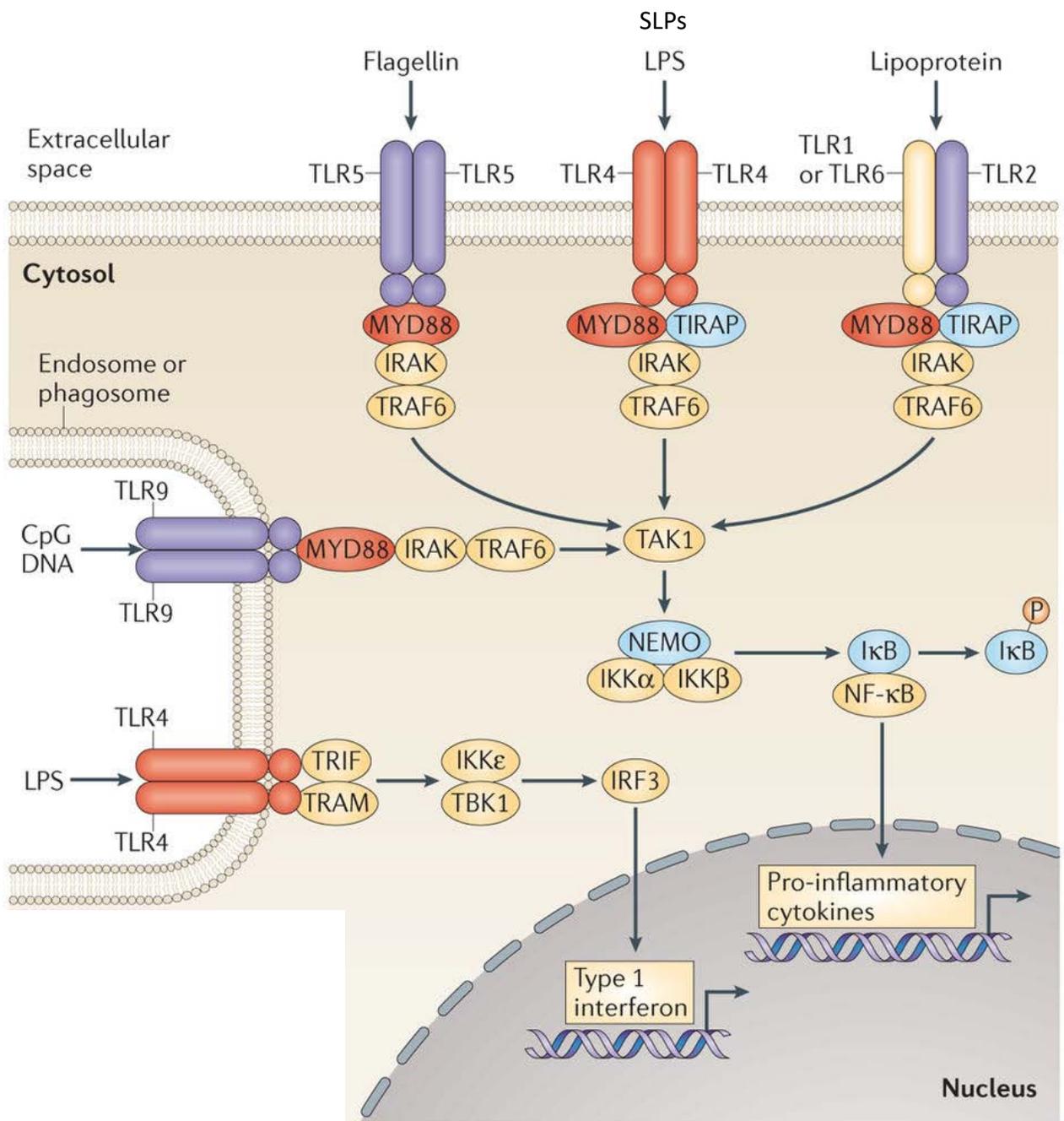
La réponse inflammatoire induite par *C. difficile* est essentiellement due à l'action des toxines dans un premier temps sur les cellules épithéliales puis dans un deuxième temps sur les cellules de l'immunité innée (Figure 13). Cependant *C. difficile* possède d'autres protéines pro-inflammatoires telles que les SLPs et la flagelline FliC pouvant interagir avec les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée après rupture de l'épithélium.

### *SLPs et réponse innée*

Certaines protéines de surfaces de *C. difficile* induisent la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée. Ains, Vohra et Poxton ont montré la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8 par des macrophages induite par différentes protéines de surface telles que les SLPs et les protéines flagellaires (Vohra and Poxton 2012; Collins *et al.* 2014b). Collins *et al.* ont confirmé la capacité des SLPs à induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Ils ont également démontré leur aptitude à augmenter l'expression des marqueurs de surface de la cellule intervenant dans la présentation d'antigène et la reconnaissance des pathogènes, augmentant ainsi leur activité phagocytaire (Collins *et al.* 2014b). Par ailleurs Lynch *et al.* ont montré que le niveau de réponse des macrophages induits par les SLPs pouvait être variable en fonction des différents ribotypes de *C. difficile* (Lynch *et al.* 2017)

Par ailleurs, les SLPs sont capables d'activer des monocytes humains avec production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 participant à la différenciation des cellules T. Les SLPs sont aussi capables d'induire la maturation des cellules dendritiques (monocyte derived dendritic cells, MDDCs) (Ausiello *et al.* 2006). Les MDDCs matures ainsi obtenues produisent de l'IL-12p70 et de l'IL-10 modulant ainsi la réponse inflammatoire et deviennent des cellules présentatrices d'antigènes capables d'induire la différenciation des cellules T en cellules Th1 et Th2. Dans une autre étude, cette même équipe a montré que les MDDCs activées par les SLPs produisaient d'avantage d'IL-10 anti-inflammatoires que d'IL-12 pro-inflammatoires, pouvant ainsi participer à la régulation de la réponse inflammatoire.

Les SLPs interagissent avec les cellules de l'immunité innée en se liant au « Toll-like receptor 4 » (TLR4). Ryan *et al.* ont montré que les deux protéines HMW-SLP et LMW-SLP étaient nécessaires à l'activation de TLR4. Par ailleurs, ces auteurs ont montré par analyse histologique dans un modèle d'ICD, que des souris TLR4 KO et MyD88 KO étaient plus sensibles à l'infection et ne développaient aucune réponse IgG contrairement aux souris de la lignée sauvage. Les SLPs induisent via la voie TLR4 la maturation des cellules dendritiques issues de la moelle osseuse en produisant ainsi de l'IL-12, de l'IL-23 et de l'IL-10 modulant la réponse inflammatoire. De plus l'activation des cellules dendritiques par les SLPs induit l'augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) et des récepteurs de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 intervenant dans la présentation de l'antigène et l'activation des cellules T. Le profil cytokinique induit par les SLPs et les cellules dendritiques correspond à l'activation des voies Th1 et Th17 et à la production



Nature Reviews | Immunology

**Figure 14.** Voies de signalisation des Toll-Like-Recepteurs induites par des PAMPs bactériens. (adapté de Gilchrist et al. Nat Rev Immunol. 2015)

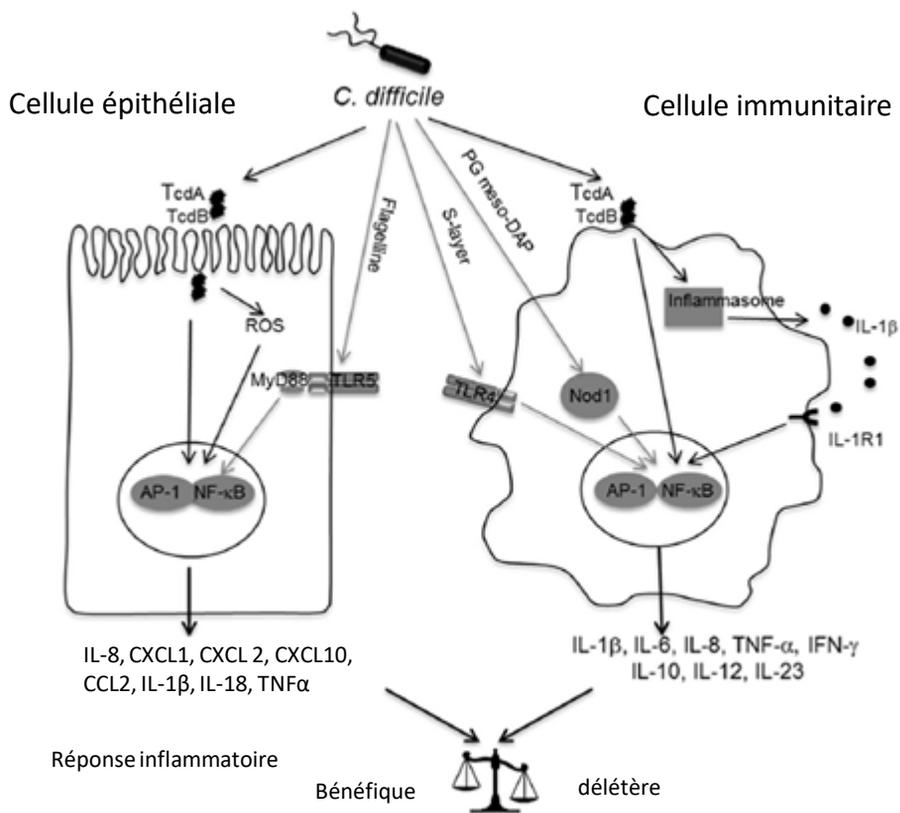


d'IFN- $\gamma$  et IL-17. De plus dans cette étude une faible réponse Th2 était induite (Ryan *et al.* 2011). Ces résultats montrent le rôle des SLPs dans la réponse immunitaire de l'hôte via l'interaction avec TLR4.

### *FliC est immunité innée*

La flagelline est un PAMP interagissant avec le récepteur TLR5 de l'immunité innée (Rumbo *et al.* 2006). Au niveau de la muqueuse intestinale, TLR5 est notamment exprimé au niveau basolatéral des cellules épithéliales ainsi qu'à la surface des cellules dendritiques (Means *et al.* 2003; Feng *et al.* 2012) et différentes cellules immunitaires telles que les lymphocytes T (Caron *et al.* 2005; Crellin *et al.* 2005). L'activation des TLRs implique l'adaptateur MyD88, une cascade de phosphorylation ainsi que l'activation de NF- $\kappa$ B induisant la transcription des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Gilchrist *et al.* 2015) (Figure 14). Yoshino *et al.* ont montré la production d'IL-8 et de CCL20 par des cellules Caco-2 suite à l'interaction FliC/TLR5 et l'activation de la voie p38 MAPK/NF- $\kappa$ B (Yoshino *et al.* 2013). Selon Batha *et al.* l'activation majeure fait intervenir la voie NF- $\kappa$ B (Batah *et al.* 2016). Par analyse transcriptomique ces auteurs ont montré que FliC induisait une régulation positive d'expression d'IL-8, TNF $\alpha$ , CCL2 et CXCL10 dans les cellules Caco2 (Batah *et al.* 2016). Par ailleurs, l'exposition de cellules Caco2 à TcdB suivie d'une stimulation par FliC entraîne une augmentation de production d'IL-8 et de CCL20 par rapport aux contrôles FliC seule et TcdB seule, témoignant ainsi du rôle conjoint des toxines et de FliC dans l'induction de la réponse inflammatoire (Yoshino *et al.* 2013).

Le rôle de l'interaction FliC/TLR5 dans la physiopathologie des ICD a été confirmé *in vivo* chez la souris par analyse histologique de l'inflammation caractérisée par la présence d'un œdème sous muqueux, d'une infiltration de cellules mononucléées et de lésions de l'épithélium après infection de souris *tlr5<sup>-/-</sup>* et sauvage par la souche 027 R20291 de *C. difficile* (Batah *et al.* 2017). En absence de TLR5 chez des souris *tlr5<sup>-/-</sup>*, l'inflammation caecale induite par la souche R20291 était diminuée significativement par rapport aux souris sauvages, de plus aucune mortalité n'était observée alors que 50 % (6/12 souris) des souris sauvages décèdent après challenge. L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de l'interaction FliC/TLR5 dans le processus infectieux de *C. difficile* chez la souris.



**Figure 15.** Réponse inflammatoire liée aux toxines et aux composants de surface de *C. difficile* (adapté de Péchiné et Collignon. Anaerobe. 2016)

Par ailleurs, ces auteurs ont comparé les propriétés inflammatoires de souches de *C. difficile* sauvages toxigènes (R20291 et 630), des souches mutantes correspondantes d'une part non flagellées (FliC<sup>-</sup>), d'autre part non toxigène (A-B-). Une diminution significative de l'inflammation intestinale était observée lors d'une infection par le mutant toxigène non flagellée FliC<sup>-</sup> (R20291-*fliC430s::CT*) et le mutant flagellé non toxigène comparativement à l'infection induite par la souche parentale R20291 et le mutant flagellé mais immobile motB<sup>-</sup> (R20291-*flgE311s::CT*). L'ensemble de ces résultats suggère que la flagelline FliC participe *in vivo* à l'activité pro-inflammatoire de *C. difficile* en association avec les toxines. On peut supposer qu'en addition de l'activité pro-inflammatoire des toxines sur les cellules épithéliales, il existe un effet synergique entre les toxines et la flagelline par l'ouverture des jonctions serrées et la rupture de la barrière épithéliale par les toxines et l'activation de la voie TLR5 au niveau basolatéral des cellules épithéliales par FliC. FliC participerait selon ce modèle à l'exacerbation de la réponse inflammatoire.

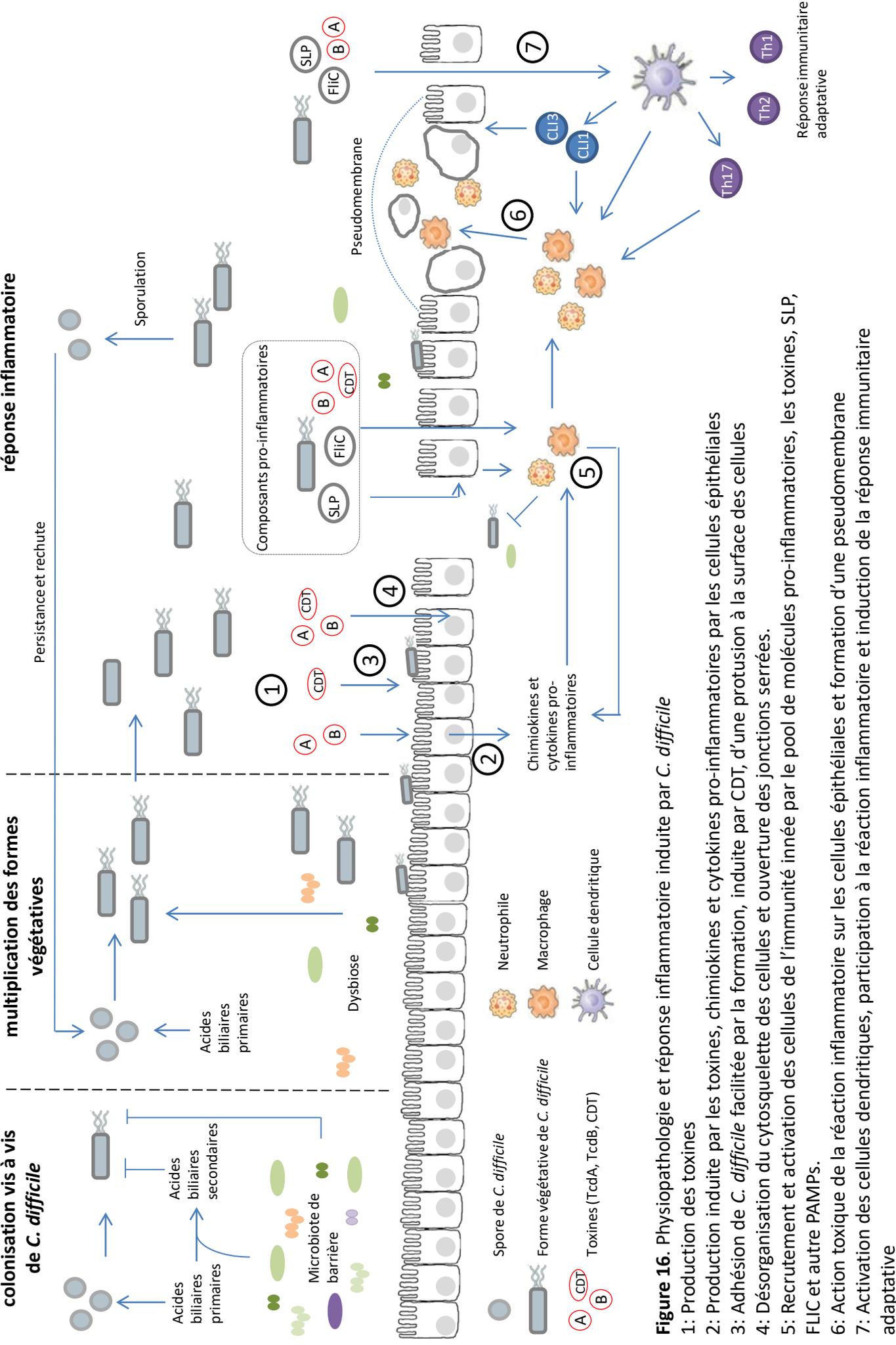
Cependant, la réponse inflammatoire induite par TLR5 peut dans un certains cas être protectrice. Jarchum *et al.* ont démontré que l'injection intrapéritonéale de flagelline de *Salmonella* serovar Typhimurium avant et après administration d'une souche de *C. difficile* toxigène induisait une protection contre l'infection chez des souris sauvages contrairement à ce qui est observé chez des souris TLR5 KO. Cette protection était caractérisée par un retard de la colonisation par *C. difficile*, une plus faible production de toxine dans le colon et le caecum et une diminution de la mortalité des souris. De plus, cette étude a montré que l'administration prophylactique de flagelline réduisait l'apoptose des cellules épithéliales et permettait le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale lors de l'ICD (Jarchum *et al.* 2011).

**Les toxines et les protéines de surface SLPs et FliC agissant comme PAMPs participent à l'induction de la réponse inflammatoire (Figure 15). La première étape de la réaction inflammatoire est induite par l'action des toxines sur les cellules épithéliales intestinales conduisant à la production de cytokines et chimiokines et au recrutement des polynucléaires neutrophiles, macrophages et mastocytes. Suite à la rupture de la barrière épithéliale, la deuxième étape de l'inflammation conduit à l'activation des cellules de l'immunité innée, par les cytokines produites ou directement par *C. difficile*. L'exacerbation de la réponse inflammatoire par l'afflux de neutrophiles, macrophages**

## Colonisation et induction de la réponse inflammatoire

## Germination des spores et multiplication des formes végétatives

## Résistance à la colonisation vis à vis de *C. difficile*



**Figure 16.** Physiopathologie et réponse inflammatoire induite par *C. difficile*

1: Production des toxines

2: Production induite par les toxines, chimiokines et cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales

3: Adhésion de *C. difficile* facilitée par la formation, induite par CDT, d'une protusion à la surface des cellules

4: Désorganisation du cytosquelette des cellules et ouverture des jonctions serrées.

5: Recrutement et activation des cellules de l'immunité innée par le pool de molécules pro-inflammatoires, les toxines, SLP, FLIC et autre PAMPs.

6: Action toxique de la réaction inflammatoire sur les cellules épithéliales et formation d'une pseudomembrane

7: Activation des cellules dendritiques, participation à la réaction inflammatoire et induction de la réponse immunitaire adaptative

**et mastocytes dans la muqueuse intestinale entraîne la formation d'un œdème inflammatoire caractéristique des colites pseudomembraneuses. Dans ce contexte inflammatoire, les cellules présentatrices d'antigènes sont activées et permettent l'induction d'une réponse adaptative muqueuse et systémique (Figure 16).**

### **3.2. *C. difficile* et réponse immunitaire adaptative**

L'évolution des ICD semble pouvoir être corrélée avec la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. Cette réponse peut être locale ou systémique et est caractérisée par la production d'anticorps dirigés contre les facteurs de pathogénicité de *C. difficile* et le développement d'une mémoire immunitaire.

#### *Réponse dirigée contre les toxines*

Les toxines sont des protéines très immunogènes, cependant malgré leur similitude de structure elles sont immunologiquement distinctes. Chaque toxine permet la production d'anticorps spécifiques sans réaction croisée entre les deux toxines. Le domaine immunogène des toxines correspond majoritairement au domaine variable C-terminal (Libby and Wilkins 1982; Leuzzi *et al.* 2013).

A la suite d'une ICD résolue, des anticorps anti-toxines sont présents dans le sérum des patients (Viscidi *et al.* 1983). De même, de nombreux sujets sains porteurs ou non de *C. difficile*, possèdent des IgG et des IgA sériques dirigées contre TcdA et TcdB (Viscidi *et al.* 1983; Aronsson *et al.* 1985; Kelly *et al.* 1992; Rousseau *et al.* 2012). En particulier, on retrouve fréquemment des anticorps spécifiques anti-toxines chez les jeunes enfants, ceci pouvant être corrélé à la prévalence élevée de portage asymptomatique dans cette population. Dans une étude descriptive, à partir d'une population aléatoire de patients hospitalisés et non-atteints d'ICD âgés d'une semaine à 79 ans, Viscidi *et al.* ont rapporté le titre d'anticorps anti-toxines sériques. Ce titre augmente pendant l'enfance et reste relativement constant à l'âge adulte témoignant un possible maintien de la réponse humorale spécifique anti-toxines (Viscidi *et al.* 1983).

De plus la production d'anticorps dirigés contre les toxines peut être associée à une évolution favorable des ICD. Kyne *et al.* ont suivi l'évolution de la réponse de type anticorps anti-

toxines parmi des patients hospitalisés atteints d'ICD. Dans cette étude, bien que 15-31% des patients hospitalisés à haut risque étaient colonisés par *C. difficile*, seule une minorité des patients porteurs a développé une ICD. Les porteurs asymptomatiques présentaient des taux d'anticorps anti-TcdA et TcdB plus élevés que les patients malades. Le portage de *C. difficile* associé à des d'IgG sériques anti-toxines était associé à une colonisation asymptomatique (Kyne *et al.* 2000).

Dans une autre étude portant sur des patients atteints d'ICD, ceux ne développant pas de récurrence présentaient un taux d'IgM anti-toxines au 3<sup>ème</sup> jour de l'infection et un taux d'IgG au 12<sup>ème</sup> jour plus important que les patients récidivant. Ainsi les patients développant une faible réponse IgG anti-toxines avaient un risque 48 fois plus élevé de récidiver (Kyne *et al.* 2001). Cette corrélation entre le risque de récurrence et la réponse IgG anti-toxines a été confirmée dans une autre étude où les récurrences étaient associées à une déficience en IgG2 et IgG3 anti-TcdA (Katchar *et al.* 2007). D'autre part, il a été rapporté qu'en plus des IgG sériques, les IgA sériques jouaient aussi un rôle dans la neutralisation des toxines (Johnson *et al.* 1995).

L'activation du système immunitaire adaptatif au niveau de la muqueuse intestinale peut entraîner notamment le phénomène de « homing » des lymphocytes et un switch isotypique IgA. La réponse systémique est aussi associée à une réponse muqueuse IgA anti-toxine neutralisante (Kelly *et al.* 1992). Au niveau de la muqueuse intestinale, un faible taux de cellules productrices d'IgA et un faible taux d'IgA sont associés à des ICD plus sévères. Ceci témoigne de l'importance de la réponse humorale muqueuse contre les ICD (Johal *et al.* 2004). Johnson *et al.* ont observé un titre d'IgA sécrétoires (IgAs) anti-TcdA plus important au niveau intestinal chez des patients convalescents par rapport aux patients non-porteurs de *C. difficile* (Johnson *et al.* 1992). Par ailleurs, Warny *et al.* ont rapporté une diminution du taux d'IgAs anti-TcdA parmi les patients récidivant comparativement aux patients ne développant qu'un seul épisode d'ICD (Warny *et al.* 1994). La réponse IgAs anti-TcdB semble jouer un rôle plus important au début de l'infection. En effet, une étude a montré qu'un faible taux d'IgA anti-TcdB était associé à une plus grande sensibilité aux ICD (Islam *et al.* 2014). L'ensemble de ces résultats démontrent la corrélation entre une réponse systémique et muqueuse anti-toxines et l'évolution des ICD.

### *Réponse dirigée contre les protéines de surface*

Comme pour les toxines, des anticorps dirigés contre les composants de surfaces de *C. difficile* sont retrouvés dans le sérum de patients asymptomatiques et de patients convalescents (Pantosti *et al.* 1989; Mulligan *et al.* 1993). Ceci suggère que les composants de surface de *C. difficile* peuvent induire une réponse humorale spécifique jouant un rôle dans l'évolution de l'infection.

En ce qui concerne les SLPs, la LMW-SLP est la sous-unité la plus immunogène et induit une réponse systémique de type anticorps chez les patients atteints d'ICD. De manière surprenante, Drudy *et al.* n'ont observé aucune différence entre le niveau d'anticorps anti-SLPs des patients porteurs asymptomatiques, des patients atteints d'ICD et des patients non porteurs. Par ailleurs, les patients développant des récurrences ne présentaient pas d'IgM au moment du premier épisode anti-SLP contrairement aux patients développant un seul épisode d'ICD (Drudy *et al.* 2004).

D'autres protéines de surface intervenant dans le processus de colonisation de *C. difficile* sont la cible d'une réponse systémique de type anticorps. Ainsi, le taux d'anticorps dirigés contre les protéines Cwp66, FbpA, Cwp84, FliC and FliD était plus faible dans le sérum de patients atteints d'ICD comparativement au sérum de patients d'un groupe contrôle (Péchiné *et al.* 2005). Une étude visant à identifier les protéines de surface immunogènes chez des patients atteints d'ICD a montré l'existence de nombreuses protéines sero-réactives. Parmi celles-ci on retrouve notamment la flagelline FliC, les SLPs et d'autres Cwp telles que Cwp84, Cwp2, et aussi la lipoprotéine CD0873 (Wright *et al.* 2008).

**Les facteurs de physiopathogénicité de *C. difficile* ont des propriétés immunogéniques et induisent une réponse adaptative de l'hôte caractérisée par la production d'anticorps circulants et muqueux spécifiques. La production de ces anticorps peut être corrélée avec le portage asymptomatique, la guérison et une sensibilité diminuée face aux récurrences. L'induction d'une telle réponse humorale spécifique protectrice contre *C. difficile* apparaît ainsi comme une alternative thérapeutique prometteuse.**

#### **4. Stratégies immuno-thérapeutiques contre les infections à *C. difficile* : revue 1**

De nouvelles perspectives de traitements des ICD et plus particulièrement des récurrences reposent sur la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Ces nouvelles stratégies thérapeutiques ont fait l'objet d'une revue intitulée : « **Immunization strategies against *Clostridium difficile*** » à paraître dans « **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health, books update on *C. difficile* in Europe, Springer Series** ».

En première partie la physiopathologie des ICD est rappelée ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte. Puis les diverses stratégies d'immunisation passive et active sont évoquées selon la voie d'administration parentérale ou muqueuse.



## **Immunization strategies against *Clostridium difficile***

**Jean-François Bruxelles, Séverine Péchiné, Anne Collignon\***

EA4043 Unité Bactéries Pathogènes et Santé (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

\* Corresponding author Anne Collignon

Tel : +33 146835529

E-mail: [anne.collignon@u-psud.fr](mailto:anne.collignon@u-psud.fr)

Séverine Péchiné

Tel: +33 1 46835883

E-mail: [severine.pechine@u-psud.fr](mailto:severine.pechine@u-psud.fr)

Jean François Bruxelles

Tel: + 33 1 46835549

E-mail: [jean-francois.bruxelle@u-psud.fr](mailto:jean-francois.bruxelle@u-psud.fr)

## **Abstract**

*C. difficile* infection (CDI) is an important healthcare- but also community-associated disease. CDI is considered a public health threat and an economic burden. A major problem is the high rate of recurrences. Besides classical antibiotic treatments, new therapeutic strategies are needed to prevent infection, to treat patients and prevent recurrences. If fecal transplantation has been recommended to treat recurrences, another key approach is to restore immunity against *C. difficile* and its virulence factors. Here, after a summary concerning the virulence factors, the host immune response against *C. difficile* and its role in the outcome of disease, we review the different approaches of passive immunotherapies and vaccines developed against CDI. Passive immunization strategies are designed in function of the target antigen, the antibody-based product and its administration route. Similarly, for active immunization strategies, vaccine antigens can target toxins or surface proteins and immunization can be performed by parenteral or mucosal routes. For passive immunization and vaccination as well, we first present immunization assays performed in animal models and second in humans and associated clinical trials. The different studies are presented according to the mode of administration either parenteral or mucosal and the target antigens, either toxins or colonization factors.

**Key words:** *C. difficile*, toxins, colonization factors, passive immunizations, vaccines.

## Introduction

*Clostridioïdes difficile* is an anaerobic spore forming intestinal pathogen responsible for post-antibiotic diarrhea and pseudomembranous colitis (PMC) (Lawson et al. 2016). *C. difficile* infection (CDI) is characterized by a large spectrum of clinical signs from asymptomatic carriage to fulminant colitis. CDI is an important healthcare- but also community-associated disease causing almost half a million infections each year in the USA (Lessa et al. 2015). Increased morbidity and mortality have been associated with the emergence of hypervirulent epidemic strains such as BI/NAP1/027 strains. Even if a decrease in prevalence of 027 strains in some European countries has been observed, CDI remains poorly controlled and 027 and other epidemic strains are still prevalent (van Dorp et al. 2016). A major problem is the high rate of recurrences, 20-30 % after a first episode and up to 60% after a first recurrence (Shields et al. 2015). Thus, CDI is considered a public health threat and an economic burden.

CDI is most commonly triggered by disruption of the intestinal microbiota by antibiotics and subsequent intestinal colonization. *C. difficile* highly resistant spores serve the transmission agent. After contamination of the host, spores germinate in response to bile acids and glycine and resume vegetative growth. Then, vegetative forms colonize the gut thanks to several colonization factors. Finally, the toxins are released and led to diarrhea and colitis. Initial colonization is influenced by the intestinal microbiota, and *C. difficile* persistence in the gut is dependent on the microbiota and the host immune response (Péchiné and Collignon 2016). Persistence of spores in the gut associated with an altered microbiota and a poor immune response could be responsible for recurrences.

Guidelines for CDI treatment have been recently updated in America and in Europe (Cohen et al. 2010; Debast et al. 2014). The treatment of a first episode is well defined and is based on antibiotherapy, such as metronidazole, vancomycin or fidaxomicin depending on the severity of the episode. In case of recurrences, variable guidelines have been recommended and there is no firm consensus on optimal treatment. Novel therapeutic strategies are needed to prevent infection, to treat patients and prevent recurrences. If fecal transplantation has been recommended to treat recurrences, another key approach is to restore immunity against *C. difficile* and its virulence factors.

*C. difficile* studies are mainly performed *in vivo* in two different animal models, the hamster and mouse models. Hamsters are extremely susceptible to *C. difficile* and are used as virulence and protection model. In mice, several models have been described either in germ

free or conventional animals. Mouse models are used to monitor intestinal colonization by *C. difficile* and also in virulence and protection assays (Best et al. 2012).

Here, after a summary concerning the virulence factors, the host immune response against *C. difficile* and its role in the outcome of disease, we review the different approaches of passive immunotherapies and vaccines developed to treat and prevent CDI.

## **1. Virulence factors and host immune response**

The main *C. difficile* virulence factors are the toxins, especially TcdA and TcdB. However, surface proteins involved in the colonization process participate also to pathogenesis (Janoir 2016).

### **1.1. Surface proteins and colonization factors**

The first interaction between *C. difficile* and the host involves bacterial surface components. Some have been identified in *C. difficile* and shown to be involved in the colonization process.

#### **1.1.1 Cell-wall proteins**

The two S-layer proteins (SLPs) are the main components of the bacterial surface and form a crystalline array over the entire cell surface. The low molecular weight (LMW)-SLP, is surface exposed, involved in cell adherence and highly variable between strains (Eidhin et al. 2006). The high molecular weight (HMW)-SLP is anchored in the cell wall, involved in adherence to intestinal tissue and extra cellular matrix proteins and is conserved between strains (Karjalainen et al. 2001; Calabi et al. 2002). Ryan et al. have shown that SLPs interact with TLR 4 and induce a pro-inflammatory response (Ryan et al. 2011).

The Cwp66 protein also serves adhesin function (Waligora et al. 2001) with its surface exposed, highly variable and highly immunogenic C-terminal domain. The cystein protease Cwp84 is also surface exposed (Janoir et al. 2007; Chapetón Montes et al. 2013) and anchored in the cell wall through its C-terminal domain. The N-terminal domain contains the proteolytic site responsible for the cleavage of the SlpA precursor into the two SLPs (Kirby et al. 2009; Dang et al. 2010) and for the degradation of extracellular matrix components facilitating therefore bacterial spread (Janoir et al. 2007). Interestingly, the Cwp84 protease is

conserved among *C. difficile* strains and has been shown to be immunogenic in humans (Péchiné et al. 2005b).

### 1.1.2 Flagellar proteins

Flagellated and non-flagellated *C. difficile* strains have been described. Flagella are involved in motility, adherence to host cells and host signalling through Toll-like receptor 5 (TLR5) (Stevenson et al. 2015).

Tasteyre et al. have shown that naturally occurring non-flagellated strains are less adherent to mouse caecum than flagellated strains and that the flagellin FliC and cap protein FliD are able to bind to murin mucus (Tasteyre et al. 2000; Tasteyre et al. 2001). More recently, it has been shown that *fliC* and *fliD* mutants in the 630 $\Delta$ erm strain displayed increased adherence to Caco2 cells compared to the parenteral strain. Thus, in 630 $\Delta$ erm genetic background, flagella do not seem to play a role in adherence (Dingle et al. 2011). In contrast, *fliC* and *fliD* mutants in *C. difficile* 027 strain R20291 displayed decreased adherence to Caco2 cells and mouse caeca suggesting a role of flagella in cell adherence and colonization (Baban et al. 2013). *C. difficile* flagellin FliC has been shown to activate an innate immune response via its interaction with TLR5 and activation of NF- $\kappa$ B signalling (Yoshino et al. 2013; Batah et al. 2016). Interestingly, Batah et al. demonstrated, in an animal model, a synergic effect of flagella and toxins in eliciting an inflammatory mucosal response (Batah et al. 2017).

In addition, toxin and flagellar genes are co-regulated in strains such as the 630 and not in others such as the R20291 (Baban et al. 2013). Thus, contribution of flagella to the pathogenic process is complex and could be different according to genetic background.

### 1.2.3 Other surface components

Other colonization factors have been characterized. The surface exposed fibronectin binding protein FbpA, (Hennequin et al. 2003; Barketi-Klai et al. 2011), highly conserved between *C. difficile* isolates interacts with fibronectin in host tissues. The heat shock protein GroEL, highly conserved, also serves adhesin function (Hennequin et al. 2001). The collagen binding protein CbpA with a N-terminal collagen-binding domain is surface-localized (Tulli et al. 2013); the lipoprotein CD0873, part of an ABC transporter, is surface-associated, displays significant adhesive properties and is immunogenic in patients (Kovacs-Simon et al. 2014); a secreted-zinc metalloprotease is able to cleave several host proteins such as IgA2, fibrinogen

or fibronectin (Cafardi et al. 2013; Hensbergen et al. 2014). Other surface components include polysaccharides (PS) such as PS-I, PS-II. However, only PS-II is common to all strains of *C. difficile* (Ganeshapillai et al. 2008).

## 1.2. Toxins

### 1.2.1 TcdA and TcdB

Both toxins have the same ABCD domain structure: the binding, cutting and delivery domains acting sequentially to deliver the N-terminal glucosyltransferase domain (GTD) in the cytosol of enterocytes (Jank and Aktories 2008). This N-terminal domain glucosylates and inactivates the Rho-GTPases leading to actin cytoskeleton disruption, cell death and epithelial barrier disruption (Voth and Ballard 2005; Popoff and Geny 2011). The receptor binding C-terminal domain (RBD) is composed of combined repetitive oligopeptides (CROPs) that are responsible for binding to cell receptors (Dingle et al. 2008).

TcdA and TcdB, despite their similar structure, are immunologically distinct. Antibodies directed to TcdA are able to neutralize TcdA but fail to neutralize TcdB, and the opposite is true for antibodies directed against TcdB (Libby and Wilkins 1982). The two toxins display high variability especially in the C-terminal domain (Leuzzi et al. 2013).

Different recombinant fragments derived from TcdA and TcdB have been identified for the generation of neutralizing antibodies (Leuzzi et al. 2013; Maynard-Smith et al. 2014). The RBD of both TcdA and TcdB was first identified as an important antigenic motif (Lyerly et al. 1990; Sauerborn et al. 1997; Belyi and Varfolomeeva 2003). In contrast, the TcdA GTD induces low antibody responses (Leuzzi et al. 2013; Maynard-Smith et al. 2014). Several regions of TcdB induce neutralizing antibodies : the central region domains (Maynard-Smith et al. 2014), the RBD (Kink and Williams 1998) and the GTD (Libby and Wilkins 1982; Leuzzi et al. 2013).

The respective role of TcdA and TcdB in pathogenesis is a key question. One group concluded that TcdB is essential for virulence (Lyras et al. 2009; Carter et al. 2015). For the other group, both toxins are responsible for disease. Interestingly the full virulence of *tcdB* mutant was restored when it expressed the binary toxin in addition to TcdA (Kuehne et al.

2010; Kuehne et al. 2014). It seems wise to take into account both toxins TcdA and TcdB for immunization strategies.

### 1.2.2. Binary toxin

An additional toxin, the binary toxin or *C. difficile* transferase (CDT) is produced by some strains (Perelle et al. 1997) such as the epidemic/hypervirulent BI/NAP1/027 strains. The CdtB component is involved in toxin binding to host cells. The CdtA catalytic component ADP ribosylates actin and leads to inhibition of actin polymerization, depolymerization of actin filaments and cell rounding. In addition, formation of microtubule-based protusions leads to enhanced adherence (Schwan et al. 2009; Papatheodorou et al. 2011; Schwan et al. 2014). Of note, there are naturally occurring TcdA- TcdB- CDT+ strains, which can be responsible for diarrhea in humans (Eckert et al. 2015).

### 1.3. Host humoral immune response against *C. difficile*

Several authors assessed the immune response to *C. difficile* surface components and toxins (Péchiné and Collignon 2016).

Regarding surface proteins, SLPs are highly immunogenic. The LMW-SLP is an immunodominant antigen, as demonstrated by the presence of antibodies against this protein in sera of patients infected by *C. difficile* (Cerquetti et al. 1992; Wright et al. 2008). Drudy et al. found that antibody levels to SLPs were similar in patients with CDI, asymptomatic carriers and controls. However, patients with recurrences failed to mount an efficient IgM immune response to SLPs compared to patients with a single episode of CDI (Drudy et al. 2004).

The adhesin Cwp66, the protease Cwp84, the flagellar proteins FliC and FliD and the Fbp protein were found to be expressed during the course of infection and to be immunogenic. Most patients with CDI developed antibodies to FliC, FliD, Cwp84 and Cwp66 C-terminal domain, confirming the expression of these surface proteins during the course of the disease (Péchiné et al. 2005a). In another study, serum antibody levels were compared in a CDI patient group with a control group. For the adhesins Cwp66 and FbpA, the protease Cwp84, and the FliC and FliD flagellar proteins, the mean level of total antibodies were statistically lower in the CDI group than in the control group suggesting a role of these antibodies in CDI occurrence (Péchiné et al. 2005b).

Concerning *C. difficile* PS, two studies in CDI patients have reported a humoral immune response specific to *C. difficile* PS. Oberli et al. detected PS-II specific IgA in CDI patient stool and Martin et al. detected PS-I specific IgA and IgG in CDI patient stool and sera respectively (Oberli et al. 2011; Martin et al. 2013).

Regarding toxins, TcdA and TcdB have been shown to be immunogenic. In some studies, a correlation was found between anti-TcdB antibodies and asymptomatic carriage or absence of recurrence. Whereas in others studies, anti-TcdA antibody levels were shown to be more significant.

Viscidi et al. found that antibody levels to TcdB were higher in sera of convalescent CDI patients than in sera of controls (Viscidi et al. 1983). Another study showed a correlation between clinical recovery without relapse, high TcdB IgG titers, and/or neutralizing antibodies (Aronsson et al. 1985).

Kyne et al. monitored antibody response to *C. difficile* toxins and non-toxin antigens over time in hospitalized patients (Kyne et al. 2000). Although 15 to 31% of high-risk hospitalized patients were colonized with *C. difficile*, only a minority developed symptomatic infection. The asymptomatic carriers had significantly higher serum IgG antibody levels to TcdA within 3 days of colonization than those who developed diarrhea. So, after contamination by *C. difficile* a rise in IgG antibody to TcdA resulted in asymptomatic colonization rather than symptomatic infection. Interestingly, serum IgG levels against TcdB and non-toxin antigens were also higher in asymptomatic carriers, but the difference was not statistically significant. The same group also observed that patients with a single episode of CDI had significantly higher levels of IgM against TcdA, TcdB and non-toxin antigens by day 3 of illness. These patients had also significantly higher levels of circulating IgG against TcdA by day 12, compared to patients who later developed recurrent CDI. After adjusting for other risk factors, patients with CDI and a low level of seric IgG against TcdA had a 48-fold greater risk of recurrence (Kyne et al. 2001).

Besides circulating antibodies, neutralizing anti-TcdA IgA in stool have been detected (Kelly et al. 1992). Warny et al. showed that fecal anti-TcdA IgA titers were significantly higher in patients who suffered a single episode compared to those relapsing (Warny et al. 1994). Johnson et al. found that anti TcdA sIgA titers were higher in the intestinal secretions of CDI convalescent patients compared to non carrier subjects (Johnson et al. 1992). Anti-TcdA secretory IgA (sIgA) could inhibit toxin binding to intestinal receptors (Kelly et al. 1992;



Warny et al. 1994). Low levels of fecal IgA and reduction in colonic IgA-producing cells associated with the gut mucosa have been shown to be associated with prolonged CDI and recurrences of infection (Johal et al. 2004). For Islam et al. in the early course of CDI (<72 hours), low specific sIgA titers against TcdB but not TcdA were associated with susceptibility to disease (Islam et al. 2014). The mucosal immunity to TcdB may be particularly important in the early stages of infection.

All these results demonstrated that the adaptative host immune response plays a role in disease presentation and outcome.

A better knowledge of *C. difficile* pathogenesis and the host response has paved the way to the development of several antibody-based products (AP) and passive and active immunization strategies have been developed for the prevention and/or treatment of CDI (Mizrahi et al. 2014).

## **2. Passive immunization strategies with antibody-based products**

Passive immunization strategies are designed in function of the target antigen (*C. difficile* toxins or surface proteins), the antibody-based product (AP) and its administration route (oral or parenteral).

Toxins, as key virulence factors, represent the first studied target for passive immunization. However, such a strategy does not act on the bacterial clearance and consequently neither on colonization or dissemination of *C. difficile* in the environment. Another rational strategy is to target the whole bacterium or its surface proteins.

In passive immunization strategies, AP must be present in the intestinal lumen in order to act directly against *C. difficile*. If administered via a parenteral route the AP should have a low immunogenicity, a good bioavailability and should be transferred from the systemic circulation to the intestinal lumen. If directly administered via the oral route, the AP faces digestion process. In both cases, the main issue of passive immunization strategy resides in pharmacokinetic properties of the AP.

Currently, the progress on antibody engineering enables to design a variety of AP ranging from polyclonal antibodies through monoclonal antibodies and various antibody fragments such as heavy-chain single domain antibodies (V<sub>H</sub>H). Therefore, the concomitant choices of

the target, the administration route, and the variety of AP explain the diversity of studies dealing with passive immunization strategies against *C. difficile*.

## 2.1. Assays in animal models

### 2.1.1. Parenteral administration of antibody-based products in animal models

#### *Polyclonal antibodies against toxins*

First, polyclonal antibodies were used in passive immunotherapy against *C. difficile*. In 1982, Libby and Wilkins were the first to demonstrate that passive immunization of mice with specific rabbit antiserum against toxins protected mice against the homologous toxin but not the heterologous toxin (Libby and Wilkins 1982). In another animal model, Giannasca et al. showed that intraperitoneally (i.p.) injection of mouse antitoxin antibodies before challenge protected hamsters in a dose-dependent manner against *C. difficile* (Giannasca et al. 1999). Robert et al. produced polyvalent anti-toxin antibodies in sheep, the i.p. administration of this anti-serum to hamsters after challenge with different strains of *C. difficile* was protective in a dose-dependent manner (Roberts et al. 2012).

#### *Monoclonal antibodies against toxins*

Then, monoclonal antibodies (MAbs) have been produced and tested in different models. Due to their high specificity and homogeneity, MAbs target a specific epitope. Corthier et al. develop a passive immunotherapy targeting specifically *C. difficile* toxins in monoxenic mice with MAbs (Corthier et al. 1991). Intravenous (i.v.) administration of a mouse monoclonal IgG targeting TcdA C-terminal repeating units was able to protect mice against lethal *C. difficile* infection. After administration, the MAb titer remained high for at least 8 days, and mice were fully protected against *C. difficile* while no mouse survives in the control group. Of note, no impact on *C. difficile* colonization in passively immunized mice was observed.

In order to develop passive immunotherapy in humans and decrease toxicity, monoclonal antibodies have been humanized (HuMAbs).

First, fully HuMAbs directed against either TcdA or TcdB were produced and studied by Babcock et al. (Babcock et al. 2006). These HuMAbs recognized the RBD of TcdA and TcdB respectively. After characterization, anti-TcdA CDA1 and anti-TcdB MDX1388 were selected for protection assays in animal models. In a classic infection model after a primary

challenge, hamsters were treated i.p. with CDA1, MDX1388, or in combination for 4 days before challenge with *C. difficile* spores. In a relapse model, treatment with CDA1 and/or MDX1388 was associated with a vancomycin treatment. CDA1 alone led to early partial protection compared to controls without treatment. However, this protection did not persist. MDX1388 administered alone did not lead to protection. Interestingly, compared to controls, combination therapy with CDA1 and MDX1388, leading to neutralization of RBD of both toxins, provided better and prolonged protection in both models. These antibodies were shown to neutralize the toxin effects of diverse and clinically relevant strains of *C. difficile*, including multiple isolates of the BI/NAP1/027 and BK/NAP7/078 strains (Hernandez et al. 2015). In addition, Babcock et al. reported that levels of circulating HuMAbs in hamsters were much lower than anticipated and that 10% of the hamsters had no detectable circulating antibodies after a total of 200 mg of antibody i.p.-administered. They suggest that it could be due to the inefficient transport of human antibodies from the peritoneum into the bloodstream, or that some hamsters develop an immune response to the human antibody leading to their rapid clearance.

Then, others produced HuMAbs targeting toxins based on the sequence of CDA1 and MDX1388 (Péchiné et al. 2017). For instance, Davies et al., have developed a mixture of three humanized IgG1 MAbs (UCB MAbs), of which one neutralize TcdA and two TcdB (Davies et al. 2013). The UCB MAbs showed high potency in a variety of *in vitro* binding and neutralization assays. Compared to CDA1 and MDX1388, UCB MAbs led to higher levels of protection in their hamster model of CDI, and displayed higher valencies of toxin binding. Interestingly, pharmacokinetic and biodistribution assays of i.p. administered humanized IgG1 in non-infected hamsters showed that antibody half-life in serum was about 6 days. MAbs were detectable in healthy hamster colon (about 28 ng/ml per cm of mucosa  $\pm$ 17) 7 days after i.p. administration of about 2 mg of humanized IgG1. This persistence may likely explain the levels of protection provided by these UCB MAbs.

Qiu et al. developed anti-TcdA and anti-TcdB HuMAbs from murine MAbs candidates. Administered parenterally, they were able to protect animals in a dose dependent manner against mortality (85% of hamster survival after *C. difficile* challenge) and to reduce the severity and duration of diarrhea associated to several *C. difficile* clinical strains (Qiu et al. 2016).

These RBD specific MAbs block toxin activity by inhibiting receptor binding and subsequently internalization in epithelial cell. Another way to block toxin activity is to target the N-terminal domain either the translocation domain (TD) or the glucosyltransferase

domain (GTD). Indeed, these domains are more conserved between *C. difficile* strains and therefore represent targets for AP against a broader range of clinical strains. For Anosova et al., the combination of three fully HuMAbs, one specific to the RBD of TcdA, and two specific for the GTD of TcdB protected hamsters from CDI (Anosova et al. 2015).

These studies showed that by targeting both toxins protection can be increased. However in these animal models MAbs were administered with several doses a few days before challenge, therefore mimicking either a prophylactic strategy or an established circulating antibody response against toxins. Circulating antibodies may reach the intestinal mucosa either via passive transudation from the blood, or via the FcRn-mediated antibody transport. Moreover, toxin-mediated epithelium damages facilitate antibody transfer.

#### *Monoclonal antibody subunits against toxins*

With the development of antibody engineering, various MAb fragments have been produced and tested (Péchiné et al. 2017).

In particular, V<sub>H</sub>H fragments or nanobodies, which correspond to the N-terminal region of a single variable (VH) domain from camel heavy chain antibody.

Yang et al. and Schmidt et al. developed two neutralizing, tetravalent, antibodies composed of V<sub>H</sub>Hs targeting both TcdA and TcdB (designated ABA and VNA2-Tcd) (Yang et al. 2014; Schmidt et al. 2016). ABA and VNA2-Tcd, two chimeric multivalent APs were composed of two V<sub>H</sub>Hs recognizing the GTD and TD of TcdA respectively, and two V<sub>H</sub>Hs recognizing the GTD of TcdB. After i.p. administration, both protected against CDI in different animal models (mice and gnotobiotic piglets but not hamsters). Moreover, ABA was able to neutralize toxins from a panel of genotypically diverse TcdA<sup>+</sup> TcdB<sup>+</sup> clinical isolates, including some BI/NAP1/027 strains. However, to increase protective efficacy of parenterally administered V<sub>H</sub>H, its serum half-life has been improved by developing a replication-deficient recombinant adenovirus expressing the heteromultimeric V<sub>H</sub>H-based agents (ABA and VNA2-Tcd). This strategy to optimize delivery has shown its efficacy to neutralize toxins and to prevent CDI.

Of note, V<sub>H</sub>H against the two fragments of CDT have been constructed but neutralization properties have only been studied in vitro (Unger et al. 2015).

#### *Polyclonal and fragments antibodies against surface proteins*

Another approach is to target colonization factors, which may help to eliminate colonizing bacteria. Few studies have tested parenteral passive immunization targeting colonization

factors with polyclonal antibodies. For instance, Malderelli et al. targeted *C. difficile* pilin with anti-PilW serum but did not obtain protection in mice against *C. difficile* (Malderelli et al. 2016). Ghose et al. produced polyclonal antibodies targeting the *C. difficile* flagellin FliC (Ghose et al. 2016b). Passive immunization of mice via i.p. route with anti-FliC hyper-immune serum was able to protect 80 % of treated mice against *C. difficile* after lethal challenge. Since FliC plays a key role in the pathogenesis ranging from bacterial colonization through immunomodulatory effects and gene regulation, protection elicited by anti-FliC antibody may involve various mechanisms.

Kandalaft et al. described the production of V<sub>H</sub>Hs targeting the SLPs (Kandalaft et al. 2015). They were only studied in vitro but surprisingly, a combination of three V<sub>H</sub>Hs targeting the LMW-SLP inhibited motility.

### 2.1.2. Mucosal administration of antibody-based products in animal models

Lyerly et al. used a bovine immunoglobulin G (IgG) concentrate (BIC) from gestating cow's colostrum vaccinated with *C. difficile* formalin inactivated culture filtrate to orally passively immunize hamsters (Lyerly et al. 1991). BIC contained high levels of neutralizing IgG specific to both toxins and probably to other antigens. Treated hamsters were completely protected from the disease during treatment period compared to controls. However, treated hamsters developed diarrhea and died after treatment cessation. These results showed for the first time that passive immunization by oral route against *C. difficile* targeting mainly toxins can protect against toxin toxicity.

Van Dissel et al. used in the hamster model an immune whey protein concentrate (Immune WPC-40; Mucomilk) containing high concentration of sIgA antibodies against the whole bacterial cell and TcdA and TcdB (van Dissel et al. 2005). Immune WPC-40 conferred 80 to 90% protection in hamsters challenged with a toxigenic *C. difficile* strain. In contrast to Lyerly et al., the protection was maintained in surviving hamsters after treatment cessation for at least 28 days. These authors suggest that sIgA directed against the whole bacterial cell may reduce *C. difficile* gut colonization and promote bacterial clearance.

Otherwise, Kink et al. tested in therapeutic or prophylactic strategy, neutralizing avian anti-toxin antibodies (IgY) directed against the C-terminal domain of TcdA or TcdB administered orally to hamsters (Kink and Williams 1998). Prophylactic treatment before challenge with anti-TcdA alone was efficient to protect hamsters from CDI. However, for therapeutic treatment, co-administration of anti-TcdA and anti-TcdB after *C. difficile* challenge was necessary to fully protect hamsters.

Targeting the colonization factors may protect against early stage of *C. difficile* infection. O'Brien et al. showed that anti-serum directed against SLP administered orally to hamsters was able to delay mortality after lethal challenge with *C. difficile* compared to untreated hamster (O'Brien et al. 2005).

The main issue of passive immunization by oral route concerns the AP stability in the digestive environment. Immunoglobulins (Igs) have to resist to acidity in the stomach, and to pancreatic enzymes in the small intestine. However antibody sensitivity to digestive enzymes depends on antibody isotype. For instance, IgG1 are more susceptible to hydrolysis by pepsin than IgG2. Trypsin, preferentially digests bovine IgG1 and IgG2 than IgM, whereas chymotrypsin preferentially hydrolyzes IgM than IgG (de Rham and Isliker 1977; Brock et al. 1977). Notably, sIgA are more resistant than IgG to degradation in the stomach and intestine (Fagarasan and Honjo 2003). This emphasizes the importance of isotype selection for oral passive immunization. Nevertheless, to improve orally administrated AP half-life, a specific formulation and/or vectorization may be recommended to maintain activity and to target *C. difficile* in the colonic infection site.

To extend life time of orally AP against *C. difficile* toxins, Andersen et al. engineered a *Lactobacillus* strain in order to express cell wall-anchored TcdB-neutralizing antibody fragments (V<sub>H</sub>H) (Andersen et al. 2015). In a prophylactic treatment in a hamster model, oral administration of a combination of two *L. paracasei* strains expressing two different V<sub>H</sub>Hs conferred a partial (50%) protection against lethal *C. difficile* challenge. Hamsters showed either no damage or limited inflammation of the colonic mucosa after 4 days of *C. difficile* infection although they were colonized by *C. difficile*.

## **2. 2. Assays in humans and clinical trials**

In humans, passive immunotherapy against *C. difficile* has been considered for treatment of a first episode or recurrent CDI. *C. difficile* infection and outcome have been associated with the presence or absence of an adequate antibody response to toxins and also some surface proteins.

### **2.2.1. Parenteral administration of antibody-based products in humans**

#### *Treatment with polyvalent immunoglobulins*

In 1991, passive immunotherapy administered to humans against CDI consisted of human polyvalent gamma globulins (Leung et al. 1991). Children with chronic recurrent CDI

presented a deficient level of anti-TcdA IgG and IgA, and i.v. administration of gamma globulins (IVGG), every three weeks (400mg/kg) was able to increase anti-TcdA IgG level in serum and was associated with resolution of clinical symptoms and clearance of toxins in stool. It was then confirmed in two adults with severe PMC receiving either 300mg/kg or 200mg/kg of IVGG; both patients presented a rapid resolution of diarrhea, pain and fever within 36 hours. The efficacy of IVGG was correlated with the presence of anti-TcdA neutralizing IgG. The mechanism of action of IVGG in treatment for CDI is most likely explained by exudation of serum proteins across an already inflamed colonic mucosa. Then, IVGG were tested in many patients with CDI with various results (Diraviyam et al. 2016). Recently, Negm et al., in 17 CDI patients, observed a therapeutic response to polyvalent i.v. immunoglobulins (IVIg) in 41% (10/17) of the patients (Negm et al. 2017). In addition, they observed differences in TcdA neutralizing efficacy between three commercial IVIg preparations as well as differences of level of specific IgG isotypes against *C. difficile* antigens. These results emphasize the diversity of polyvalent immunoglobulins either regarding isotype or specificity.

#### *Clinical trials with monoclonal antibodies*

After successful assays in animal models, CDA1 and MDX1388 targeting TcdA and TcdB RBD respectively, were selected and tested in clinical trials (Table 1).

A phase I with CDA1 in healthy volunteers was completed (Taylor et al. 2008). Single injection of CDA1 at different doses did not lead to serious adverse events nor anti-human antibodies production. The half life of CDA1 ranged from 25 to 31 days. Two phase II clinical trials were performed. In the first phase II, CDA1 was tested in patients receiving standard-of-care (SOC) treatment for CDI and in a placebo group. The recurrence rate was not significantly different between the two groups (Leav et al. 2010). A second phase II trial (sponsored by University of Massachusetts and Medarex Inc.) tested the efficacy of the combination of CDA1 (actoxumab, MK-3415) and MDX1388 (bezlotoxumab, MK-6072) in patients with symptomatic CDI with SOC antibiotics (NCT00350298) (Lowy et al. 2010). The recurrence rate was significantly lower in the patient group treated with this combination (7%) compared to placebo group (25%). Two phase III trials have been completed under Merck licence (MODIFY I NCT01241552 and MODIFY II NCT01513239). They were randomized, double-blind, placebo-controlled trials conducted at 322 sites in 30 countries involving 2655 adults receiving SOC antibiotics for primary or recurrent CDI. The primary end point was recurrent infection. MODIFY I was a four-arm study: patients were randomly

assigned to receive a single dose of bezlotoxumab (10mg/kg), actoxumab (10mg/kg), actoxumab plus bezlotoxumab (10mg/kg each), placebo. Interestingly, this clinical trial did not show a significant efficacy of actoxumab alone on recurrence rate. Actoxumab alone was discontinued after an interim analysis and not evaluated alone in MODIFY II. Thus MODIFY II is a three-arm study: bezlotoxumab (10mg/kg), actoxumab plus bezlotoxumab (10mg/kg each), placebo. In both trials, the recurrence rate was significantly lower with bezlotoxumab alone or with actoxumab than with placebo. However, addition of actoxumab to bezlotoxumab did not improve efficacy, which may attest a major role of TcdB in the pathogenesis (Wilcox et al. 2017). The rate of adverse events was similar among the 3 groups; the most common events were diarrhea and nausea. The use of a single dose was supported by the long half-life of the MAbs (approximately 19 days). To date, bezlotoxumab (Zinplava<sup>TM</sup>) is the only AP against *C. difficile* i.v. administered approved for clinical use by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency. It is indicated to reduce recurrence of CDI in patients 18 years of age or older who received SOC antibiotic treatment for CDI and are at high risk for recurrence. Another phase III trial in children (1-17 years of age) (MODIFY III) is ongoing but not yet recruiting.

Systemically administered AP targeting the toxins can protect from recurrent CDI. However, it does not confer a locally oriented and a long lasting protection against *C. difficile*. To date, no clinical trial has evaluated parenteral passive immunization targeting *C. difficile* colonization factor. Circulating antibodies are poorly transferred through a healthy intestinal mucosa and are most likely to encounter *C. difficile* after epithelium disruption. So, investigators have assessed the protective efficacy of orally administered AP to target toxin and *C. difficile* colonization in the intestinal tract.

#### 2.2.2. Mucosal administration of antibody-based products in humans and clinical trials

Van Dissel et al. tested WPC-40 in 16 patients with confirmed CDI, among them 9 had a history of relapses (van Dissel et al. 2005). No adverse effect was observed during the follow-up. In addition, no toxin was detected in feces after treatment in 14 out of 15 patients and *C. difficile* could no longer be cultured from the stools in 9 out of 15 subjects. Interestingly, none of the patients experienced another episode of CDI after treatment during the follow-up. In accordance with this study a larger cohort was conducted in 101 patients with CDI (median age 74 years). After completion of at least 10 days of antibiotic treatment, patients received orally anti-CD-WPC for 2 weeks and were followed during 60 days. Interestingly, only 10%



relapsed within the follow-up. A phase 2 clinical trial has been performed and completed but the results are not posted (NCT00177775).

After a phase I, Mattila et al. performed a double-blind phase II study comparing another *C. difficile* immune whey IgG concentrate (CDIW) with metronidazole for recurrent CDI (Mattila et al. 2008). CDIW was produced from colostrum of cows immunized with formalin inactivated *C. difficile*. Patients included in the study were adults who experienced at least two episodes of CDI. No statistically significant differences were observed between the two treatment groups. At the end of study 8 patients out of 18 experienced a relapse in CDIW (44%) treated group and 9 out of 20 in Metronidazole group (45%). These authors suggest that partial failure may probably be explained by a weak neutralization of colonization and toxin activity in vivo. These results emphasize the need of a well-engineered AP with high specificity and neutralizing activity in the infection site.

To conclude, the development of passive immunization strategies against *C. difficile* has led to many interesting AP targeting toxins but only a few targeting colonization factors. APs are developed mainly for the prevention of recurrences associated with SOC antibiotic treatment against CDI. Currently, the most efficient strategy to prevent recurrences is to target and neutralize toxins systemically. Even well tolerated, these treatments are costly and do not confer a long lasting protection. In addition passive immunization strategies targeting toxins alone do not influence intestinal colonization nor prevent epidemic burden. To obtain a long term protection vaccines have been developed.

### **3. Active immunization strategies: vaccines**

Active immunization strategies are characterized by the type of the induced antibody response and depend on the targeted antigen, the administration route and regimen.

Vaccine candidates must be immunogenic to induce an antibody response. Obviously this antibody response must be protective against *C. difficile*. The targeted antigen must be specific to *C. difficile* and conserved among diverse clinical strains. It must be biologically accessible to the antibody produced, restricting vaccine candidates to surface and released or secreted antigens. We have seen that anti-toxin antibodies are associated with protection against CDI and recurrences. So, as in passive immunization strategies, toxins represent the first target studied for vaccination strategies against *C. difficile*. However, to prevent

colonization, and therefore to limit dissemination of the bacteria in the environment, surface antigens represent an interesting alternative.

Protective antibody response to *C. difficile* can be either systemic or mucosal. The immune response induced depends on the administration route and the adjuvant used (Zhang et al. 2015; Savelkoul et al. 2015). Here, we discuss the different vaccination strategies against *C. difficile* targeting toxins or colonization factors tested in animal models and in humans clinical trials after vaccination by parenteral or mucosal routes.

### **3.1. Vaccines targeting toxins**

#### **3.1.1 In animal models**

##### *Parenteral immunization in animal models*

The respective role of TcdA and TcdB in the pathogenesis has been investigated in vaccination assays as well. Usually, both toxins are simultaneously used as vaccine antigens. The first generation of vaccine was composed of formalin-inactivated toxins (toxoids) from culture filtrate, then toxoids were purified. Libby et al. and Fernie et al. obtained a full protection of hamsters against *C. difficile* after immunization with inactivated culture filtrate with Freund adjuvant (Libby et al. 1982; Fernie et al. 1983). In contrast, other authors (Kim et al. 1987) observed that toxoid A was sufficient to protect hamsters against *C. difficile*. However, differences in vaccination regimen, antigen purity and *C. difficile* strain could explain the discrepancies between studies. Recently, a highly purified toxoid vaccine targeting TcdA and TcdB, adjuvanted with alum, has been developed and first tested in animal models (Anosova et al. 2013). Intramuscular (i.m.) immunization of hamsters was protective against mortality and disease in a dose-dependent manner, with 90% of protection with the highest dose tested. The protection was correlated with a neutralizing toxin-specific IgG response. These promising results in animal models using toxoids in parenteral vaccination against *C. difficile* have led to the development in clinical trials, which will be further discussed.

In a second generation of vaccine, alternatives to toxoids were investigated with vaccine based on non-toxic recombinant fragments of *C. difficile* toxins such as the antigenic C-terminal RBD. Sauerborn et al. first used recombinant *C. difficile* TcdA C-terminal domain in a subcutaneous (s.c.) immunization assay in mice with Freund's adjuvant (Sauerborn et al. 1997). Seven out of ten immunized mice were protected against a lethal dose of TcdA,

correlated with production of anti-TcdA antibodies. Then, different combinations of recombinant toxin fragments have been used in parenteral immunizations. For instance, hamsters were immunized via i.p. route with a combination of fragments adjuvanted with MF29, the RBD of TcdA associated either with TcdB GTD or TcdB RBD fragment (Leuzzi et al. 2013; Spencer et al. 2014). These combinations induced systemic IgGs, which neutralized both toxins and protected vaccinated hamsters from a lethal challenge of various *C. difficile* ribotypes. Karczewski et al. obtained full protection of hamsters after i.m. immunization with toxoid A and B adjuvanted with aluminum hydroxyphosphate sulfate and ISCOMATRIX™. Only partial protection was obtained with full length toxoid A combined with different fragments of TcdB (the enzymatic domain + different fragments of the C-terminal domain) (Karczewski et al. 2014). To reduce the antigenic cocktail, fragments can be fused and the larger fusion protein may benefit of an increased immunogenicity. Tian et al. constructed a recombinant fusion protein composed of TcdA and TcdB RBD fragments (Tian et al. 2012). This fusion protein was shown to be immunogenic in mice after i.m immunization and the produced antibodies were able to neutralize toxin cytotoxicity. In addition, in the hamster model full protection against *C. difficile* challenge was observed. Wang et al. constructed a chimeric atoxic toxin constituted of inactivated GTD and the translocation domain from TcdB and the RBD from TcdA (cTxAB) (Wang et al. 2012). A rapid and potent neutralizing antibody response against both toxins was induced after parenteral immunization of mice with cTxAB adjuvanted with alum. cTxAB parenteral immunizations protected mice from a primary infection and relapses as well, thus conferring a long lasting protection against *C. difficile*. With the emergence of hypervirulent strains such as BI/NAP1/027 strains producing the binary toxin, it could be of interest to broaden vaccine protective efficacy. Secore et al. (Secore et al. 2017) recently described a tetravalent vaccine composed of recombinant inactivated TcdA and TcdB and binary toxin components CDTa and CDTb adjuvanted with ISCOMATRIX i.m-administered in hamsters. The addition of CDT to TcdA and TcdB significantly improved vaccine efficacy against BI/NAP1/027 strains. Interestingly, they observed that this tetravalent vaccine was able to elicit neutralizing antibodies against the three toxins in hamsters and in Rhesus macaques. Another group targets TcdB variants, TcdA and CDT (Tian et al. 2017). They produced two fusion proteins, a trivalent one with CDTb/TcdB<sub>(003)</sub>/TcdA (T-toxin) and a quadravalent one with CDTb/TcdB<sub>(003)</sub>/TcdA/TcdB<sub>(027)</sub> (Q-toxin). They i.m. immunized mice and hamsters with T-toxin or Q-toxin with alum as adjuvant and showed that these vaccination induced toxin neutralizing antibodies to each of the toxins and a broad protection in hamster against *C. difficile* 630

(ribotype 003) and *C. difficile* ribotype 027 strains. Taken together these studies showed the interest of multivalent fusion proteins as vaccine antigens.

To increase antigen immunogenicity, polypeptide with immunoadjuvant properties can be fused to the targeted antigen. For instance, Ghose et al. constructed a fusion protein constituted of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium flagellin subunit D1 as an innate immune agonist and the RBDs of TcdA or TcdB as targeted antigen (Ghose et al. 2013). After i.p immunization, mice displayed more anti-TcdA IgA and the same level of anti TcdB IgA in stool than mice immunized with unfused antigen adjuvanted with alum or heat-labile enterotoxin. Concerning the circulating IgG response, immunization with the fusion protein induced a higher anti-TcdA response than non-adjuvanted unfused antigens. However, the same level of anti-TcdA response was observed with the fusion protein and adjuvanted unfused antigens.

Parenteral vaccination with non-toxic recombinant vaccines showed promising results in animal models. Of note, these fragment vaccines have several advantages compared to toxoid vaccine, such as elimination of the potential risk of incomplete toxoid inactivation, large-scale production in a cost effective way and decrease of batch-to-batch variations (Wang et al. 2015).

In the third generation of vaccine, vectorized antigens and DNA vaccines targeting *C. difficile* were investigated. DNA vaccines are versatile, stable and easy to produce. DNA vaccines facilitate antigen presentation and enable proper protein folding for correct epitope presentation. In addition, DNA vaccines have the ability to induce both humoral and cellular immune response and a good immune priming (Saade and Petrovsky 2012). Gardiner et al. were the first to test DNA vaccination against *C. difficile* (Gardiner et al. 2009). A synthetic gene TxA-RBD optimized for expression in human cells was constructed. Mice were inoculated by electroporation with the TxA-RBD expressing plasmid and then challenged with a lethal dose of purified TcdA. Treated mice were fully protected and presented a strong serum anti-TcdA IgG antibody response. Jin et al (Jin et al. 2013) screened the immunogenicity of various toxin fragments by DNA vaccination. Antibody response was elicited by two DNA vaccines, one expressing fragment of the TcdA RBD (TcdA-C), the other expressing the TcdA catalytic N-terminal domain (Tcd-N). Passive transfer in mice of immune serum elicited with both TcdA-C and TcdB-N fully protected mice against a lethal dose of *C. difficile* concentrated culture filtrate. Baliban et al. constructed an optimized DNA

vaccine encoding the RBD of TcdA and TcdB and showed that i.m followed by electroporation in mice and non-human primates was able to promote a strong serum IgG but not IgA response associated with neutralizing IgG antibodies to both toxins in blood and interestingly in stool (Baliban et al. 2014). In addition, immunized mice were significantly protected against *C. difficile*. Seregin et al designed an adenovirus-based vaccine targeting TcdA (Seregin et al. 2012). This vaccine induced a rapid and strong antibody response and a T cell response against TcdA, which led to full protection in mice after *C. difficile* challenge. DNA vaccines benefit from several advantages but also display disadvantages such as poor immunogenicity in humans and need to be further optimized to be used in clinical trials (Saade and Petrovsky 2012; Khan 2013).

All these three generations of parenteral vaccines targeting toxins aim to induce a systemic response. However these studies did not report the induction of a parallel mucosal immune response. Even if, anti-toxin circulating IgG antibodies against *C. difficile* can be protective they are less likely effective locally on the early step of infection. In contrast, mucosal IgA response would be more likely able to rapidly act locally on the infection site.

#### *Mucosal immunization in animal models*

Immunizations via mucosal routes appear an interesting mode to induce mucosal immunity. Torres et al. to identify the best route of immunization for a protective vaccine against *C. difficile* in hamsters, compared mucosal (intra-nasal i.n., intra-rectal i.r., intra-gastric i.g.), parenteral (s.c, i.p) and a combination of mucosal and parenteral routes (i.n. and i.p.) with formalin-inactivated culture filtrate of toxigenic *C. difficile* with CT as adjuvant for mucosal immunizations and RIBI for parenteral immunizations (Torres et al. 1995). The i.n., s.c. and i.p. routes led to full protection. Giannasca et al. in a vaccination strategy targeting toxins tested several immunization routes. The optimal protection was obtained with combined i.m and i.r routes (Giannasca et al. 1999).

Inducing mucosal immunity via the mucosal route encounters many difficulties. Antigens have to cross mucosal surface to be uptaken by immune cells. In addition, the mucosal immune system is closely interacting with the intestinal microbiota resulting in important regulation and immune tolerance (Chen and Cerutti 2010; Xiong and Hu 2015). Adjuvants and vectorization are key factors to modulate mucosal immune system and develop a mucosal vaccine (Lavelle 2005).

Even if after i.n immunization the intestinal mucosa can be stimulated through mucosal homing, it is not the optimal route to induce an intestinal antibody response compared to the oral route. Antigen vectorization is recommended for oral immunizations. Ryan et al., were the first to use a live attenuated bacterial vector for oral immunization (Ryan et al. 1997). A live attenuated *V. cholerae* strain was used, expressing a fusion protein consisting of the C-terminal RBD of TcdA fused to the secretion signal of *E. coli* hemolysin A as secretion system, co-administered with CT as adjuvant to orally immunize rabbits. Vaccination induced an anti-TcdA IgG response but did not significantly induce an IgA response. However, in an ileal loop challenge assay, this vaccination was protective against TcdA. Permpoonpattana et al. used a *Bacillus subtilis* spores as vehicle to orally deliver the carboxy-terminal repeat domains of TcdA alone or with TcdB in mouse and hamster vaccination assays (Permpoonpattana et al. 2011). Such a strategy was able to induce a neutralizing and protective mucosal IgA and systemic IgG response. Of note, neutralizing sIgA antibodies to the TcdA repeat domain were shown to be cross-reactive with the analogous domain of TcdB. In this study, antibodies against only TcdA can mediate protection. In addition, they provide protection against challenge with A+/B+ toxigenic *C. difficile* strains. Recently, Hong et al. expressed in *Bacillus subtilis* spores the same carboxy terminal domain of TcdA (A26-39; codons for Ser<sub>2388</sub> to Pro<sub>2706</sub>) and immunized hamsters (oral and sublingual routes) (Hong et al. 2017). Hamsters were protected after challenge with *C. difficile* strain 630. In addition, protection was associated with the absence of *C. difficile* toxins and spores in fecal samples and high level of fecal IgA and circulating IgG anti TcdA<sub>26-39</sub>. The authors suggest that antibodies induced by TcdA<sub>26-39</sub> cross-react with seemingly unrelated proteins expressed on the vegetative cell surface or spore coat of *C. difficile*. Another approach developed by Guo et al. used a *Lactococcus lactis* strain to express the TcdA and TcdB RBD (Guo et al. 2015). After oral administration in mice, animals were partially protected against *C. difficile* challenge correlated with an IgG and sIgA specific response in immunized mice. Live vaccines benefit from the ideal features of an effective mucosal delivery system such as antigen protection from degradation, antigen delivery to mucosal surface, antigen uptake by target cells, and expression of potent immunostimulatory molecules.

### 3.1.2. In humans and clinical trials

The positive results of animal vaccination assays constitute a proof of concept for the development of human vaccines (Table 2).

*Parenteral immunization in humans and clinical trials*

Safety, immunogenicity and dose response of the highly purified formalin inactivated toxoid A and B vaccine, previously tested in hamsters, have been assessed in human volunteers. After i.m injection with alum as adjuvant vaccination was well tolerated and volunteers developed neutralizing anti-toxin antibodies in serum (Kotloff et al. 2001). Then, Sougioultzis et al. tested this vaccine in three patients with recurrent CDI (Sougioultzis et al. 2005). After vaccination, the patients discontinued treatment with oral vancomycin without any further recurrence.

First, this toxoid vaccine was developed by Acambis (ACAM-CDIFF™) and then by Sanofi-Pasteur (CDIFFENSE™). Four phases I clinical trials have been completed (NCT00127803, NCT00214461, NCT00772954, NCT01896830) (Greenberg et al. 2012). Safety and tolerability were observed associated with a good immunogenicity.

A phase II trial for therapeutic use assessed safety and efficacy against recurrences. The objective was to compare the event rate of CDI in groups assigned to the vaccine versus placebo in the 9-weeks period after the third dose of the study vaccine in subjects with first episode of CDI receiving antibiotics SOC (NCT00772343). A phase II trial for prophylactic use assessed safety and efficacy against CDI. The objective was to evaluate in adults at risk of CDI in all dose groups of the vaccine versus placebo, the safety and the immune response elicited (NCT01230957) (de Bruyn et al. 2016). No safety issue was observed. In addition, vaccination induced a strong neutralizing IgG response specific to both TcdA and TcdB. The best antibody response was induced after 3 immunizations with the highest dose (100µg) adjuvanted with alum. This formulation elicited this immune response at least for 180 days. A phase III clinical trial is ongoing. It is recruiting 10,000 adults ( $\geq 50$  years of age) at risk for CDI to assess the efficacy to prevent primary symptomatic episode (NCT01887912).

In parallel, Pfizer (USA) develops a genetically modified full length TcdA and TcdB toxoid vaccine. A Phase I clinical trial in healthy adults (50 to 85 years of age) has been completed and assessed safety, immunogenicity by testing a 3-dose vaccination regimen by i.m route with one of three dose levels of *C difficile* vaccine with or without alum as an adjuvant (NCT01706367) . Only mild to moderate local reactions and systemic events could be observed. No clear dose-level response pattern was detected. Vaccination induced potent antitoxin neutralizing immune response in all groups, still evident in immunized subjects at month 12 (Sheldon et al. 2016). A phase II trial assessed the safety and tolerability of the 3 doses vaccine in healthy adults aged 50 to 85 years (NCT02117570). Another phase II trial is

ongoing to study the safety, tolerability and the subjects' immune response to the vaccine. Two different vaccine schedules will be compared (low dose and high dose). Each subject will initially receive 3 doses of vaccine or placebo, then one year after the third dose subjects that did not receive placebo will be randomized to receive a fourth dose. Subjects will be followed for up to 4 years after their third vaccination (NCT02561195). A phase III is currently recruiting (NCT03090191) and will assess efficacy against primary CDI and recurrence.

Valneva (Austria) announced positive Phase I results for its *C. difficile* vaccine candidate VLA84 (formerly IC84), a recombinant fusion protein consisting of truncated forms of TcdA and TcdB. Phase Ia/Ib trials showed good safety and tolerability profile of the vaccine (Bézay et al. 2016). VLA84 was highly immunogenic and was able to induce similar immune responses to TcdA and TcdB in adults and elderly subjects (NCT01296386). A dose-confirmation, immunogenicity and safety study in 500 healthy adults ( $\geq 50$  years) in a phase II trial has been completed (NCT02316470).

All these three vaccines aim to induce a systemic antibody response against both toxins and showed promising results and could elicit long lasting protection. However today, no vaccine has been approved for clinical use..

#### *Mucosal immunization in humans and clinical trials*

Currently, only one trial was performed and aimed to elicit both mucosal and systemic immune response to *C. difficile* toxins. A phase I clinical trial under the supervision of Cutting S.M. (Royal Holloway University) and funded by the European Union 7th Framework Programme assessed the safety and immunogenicity of an oral vaccine against *C. difficile* in healthy adults (CDVAX). Their approach was a novel mucosal vaccine delivery system based on the use of inactivated *Bacillus subtilis* spores that express two different recombinant *C. difficile* antigens on their surface, a toxoid antigen and a unique spore colonization factor. Adverse events were monitored and specific mucosal and systemic immunity (sIgA, circulating IgA and IgG) were evaluated in this trial (NCT02991417).

### **3.2 Vaccines targeting surface components**

Several studies rationalized the concept of targeting surface components to develop vaccines (Mizrahi et al. 2014). To induce a specific immune response against *C. difficile* and limit



cross-reactivity, vaccines target specific *C. difficile* surface components conserved among strains. Presently, all these vaccines are in pre-clinical development in animal models.

#### *Parenteral immunization in animal models*

Several antigen candidates have been investigated for parenteral vaccination targeting *C. difficile* surface components.

After s.c mouse immunization with nontoxigenic *C. difficile* membrane fraction adjuvanted in an oil emulsion (TiterMax Gold adjuvant), Senoh et al. induced a specific IgG and IgA response in sera and intestinal fluids, respectively. Interestingly hyperimmune sera and intestinal fluids were able to inhibit *C. difficile* adhesion in vitro to human intestinal Caco2 cells (Senoh et al. 2015). One approach aims to target *C. difficile* surface proteins involved in bacterial gut colonization and participating to *C. difficile* pathogenesis. For instance, Ní Eidhin et al. i.p immunized hamsters with crude SLPs from a clinical *C. difficile* strain (PCR ribotype 001) with either alum or RIBI as adjuvant (Ní Eidhin et al. 2008). Hamsters immunized with alum mounted a strong IgG response whereas hamsters immunized with RIBI mounted a weak IgG response. However, all immunized hamsters developed diarrhea and died after *C. difficile* challenge. Recently, another study successfully tested *C. difficile* flagellin FliC in i.p vaccination assay (Ghose et al. 2016b). Ghose et al. i.p immunized mice and hamsters with recombinant FliC adjuvanted with alum. As expected, immunization induced a high systemic anti-FliC IgG response in mice. In addition, immunized mice were fully protected against a clinical epidemic 027 strain (UK1) whereas immunized hamsters were partially protected against strain 630 $\Delta$ erm. Surface spore proteins have also been tested as vaccine antigen. Indeed, spores may play an essential role in persistence of *C. difficile* in intestine. Ghose et al. tested several spore proteins and i.p immunized mice with the exosporium CdeC or CdeM proteins with alum as adjuvant. They observed a full protection in mice against the 027, UK1 strain. This protection was correlated with circulating specific IgG and a significant decrease of the level of spore shedding compared to controls (Ghose et al. 2016a). In addition, these spore proteins were also able to afford a 80% protection against 630 $\Delta$ erm in vaccinated hamsters.

Another approach is to target highly specific antigens abundantly present on *C. difficile* surface, such as cell wall polysaccharides (Monteiro et al. 2013; Monteiro 2016). Oberli et al. (Oberli et al. 2011) and Romano et al. (Romano et al. 2014) showed PS-II immunogenicity in mice with respectively diphtheria toxoid (CRM<sub>197</sub>) or recombinant TcdA and TcdB fragments as carrier protein, to make PS immunogenic. PS-I was shown immunogenic in CDI patients.

Interestingly, patients with CDI presented anti-PS-I IgG in serum and anti-PS-I IgA in stool. Mice immunized with synthetic PS-I-CRM<sub>197</sub> conjugate adjuvanted with either alum or Freund's adjuvant produced specific anti PS-I IgG, IgM and IgA (Martin et al. 2013). In addition, Martin et al. identified a minimal epitope in PS-I, which is the disaccharide RhA(1-3)-Glc. Then, the same group (Broecker et al. 2016a) constructed a pentavalent glycoconjugate based on the PS-I minimal epitope with an increased antigenicity. Of note, this synthetic pentavalent vaccine candidate elicited a weak but highly specific IgG response to native PS-I glycan in mice. However, the vaccine efficacy was not tested.

*C. difficile* LTA (also named PS-III) has been shown to be conserved in *C. difficile* strains. Cox et al. (Cox et al. 2013) constructed different glycoconjugates, and immunization of mice induced a specific IgG response. Rabbit and mouse hyperimmune anti-sera recognized *C. difficile* live vegetative cells and spores. Broecker et al. (Broecker et al. 2016b) constructed a semi synthetic LTA-CRM<sub>197</sub> glycoconjugate that elicited anti-LTA IgG in mice with or without alum adjuvant. Anti-LTA antibodies recognized *C. difficile* surface and significantly limited bacterial mouse gut colonization five days post challenge.

#### *Mucosal immunization in animal models*

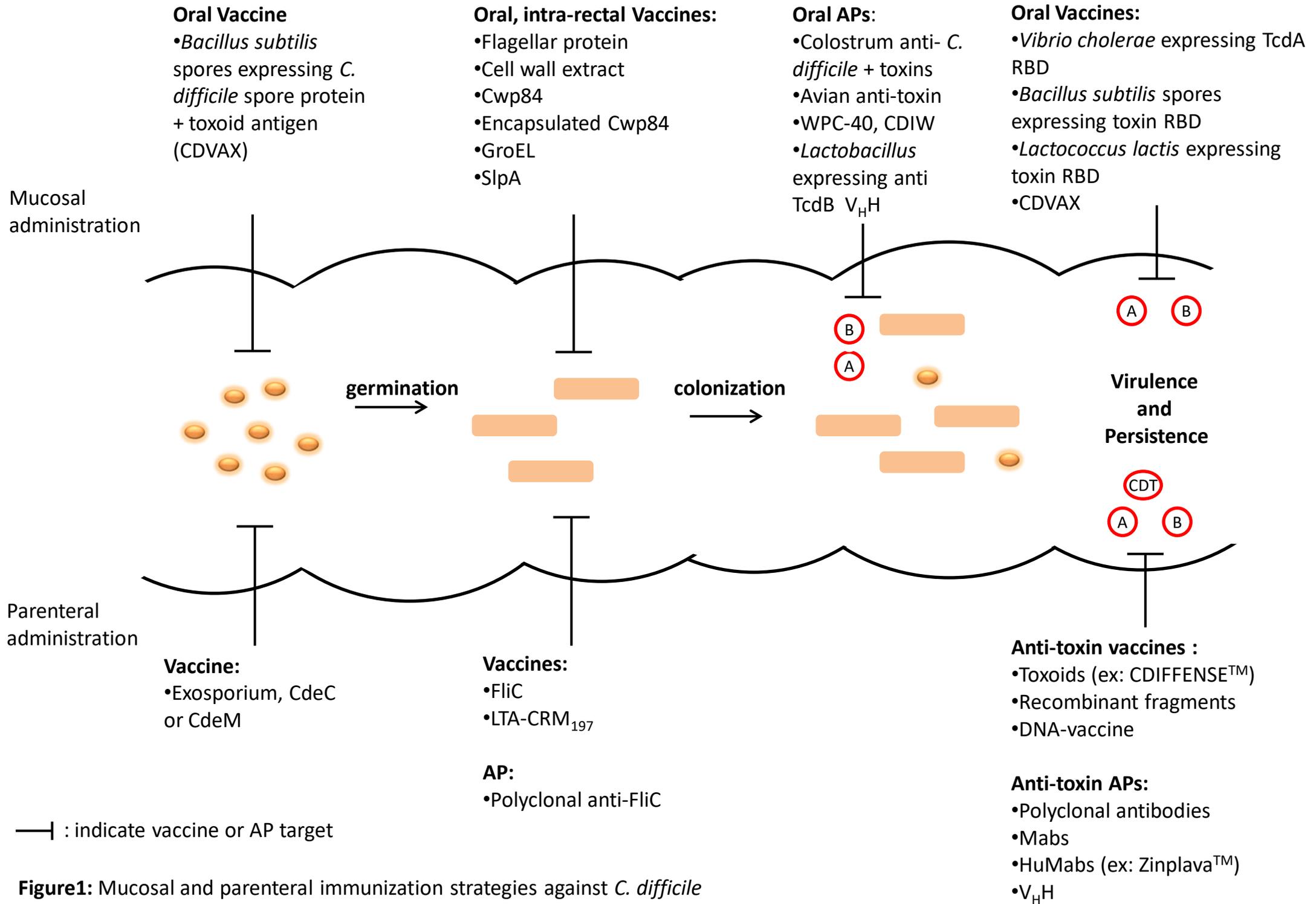
A mucosal immunization targeting surface proteins compared to parenteral immunization aims to induce locally an immune response against *C. difficile* correlated to a decrease of bacterial gut colonization. Several vaccine candidates have been tested via mucosal routes in animal models.

After i.r immunization in human microbiota-associated mouse model with a *C. difficile* toxin free cell wall extract adjuvanted with CT observed, after *C. difficile* challenge, a significant decrease of bacterial gut colonization in immunized mice compared to controls was observed (Péchiné et al. 2007). Péchiné et al. evaluated *C. difficile* surface proteins as mucosal vaccine candidates in this mouse model (Péchiné et al. 2007). First, the flagellar cap protein FliD was used to determine the best mucosal route of immunization between i.r, i.g and i.n. The best immune response was induced with FliD and CT as adjuvant via the i.r route, leading to systemic anti-FliD IgG and mucosal sIgA response. Then, to prevent *C. difficile* gut colonization, mice were i.r immunized with CT as adjuvant with flagellar preparation containing FliC and FliD or an association of Cwp84 and FliD as antigens. All immunized groups showed a significant decrease of intestinal colonization from day 13 after challenge. In another study aiming to identify protective surface antigens of *C. difficile* in mucosal vaccination, Péchiné et al. (Péchiné et al. 2013) i.r immunized hamsters with a cell wall

extract of a non-toxicogenic *C. difficile* strain adjuvanted with CT. A partial protection of hamsters (33%) against a lethal dose of *C. difficile* was observed. Using a comparative proteomic analysis between sera from protected immunized animals and sera from the control group, three proteins have been identified as key factors leading to production of protective antibodies: the chaperon protein DnaK, the heat shock protein GroEL and the S-layer protein precursor SlpA. GroEL was used as antigen to i.n. immunize mice with CT as adjuvant and was able to induce a systemic anti-GroEL IgG response associated with a significant decrease of bacterial colonization from day 8 after *C. difficile* challenge. Recently, Bruxelle et al. tested the SlpA precursor as vaccine antigen (Bruxelle et al. 2016). Immunization (i.r.) of mice with SlpA as antigen and CT as adjuvant induced a systemic anti-SlpA IgG and a mucosal sIgA response. Furthermore, this regimen induced a trend in decrease of *C. difficile* intestinal colonization significant at day 10 after challenge. In the hamster model, this immunization regimen led to a partial and non-lasting protection against *C. difficile*. In comparison, Ní Eidhin et al. (Ní Eidhin et al. 2008) immunized hamsters with crude SLP extract. They tested different vaccination regimens with different antigen doses, different adjuvants and different routes of immunization (i.p prime with RIBI adjuvant, i.n prime with CT, i.n boost with CT). The best protection was obtained in hamsters immunized with the i.p prime and i.n boost combination, 2 hamsters out of 3 survived after a lethal challenge. In mice, this regimen induced a strong circulating anti-SLP IgG and IgA response.

Immunization (i.r, i.n. or s.c) of hamsters with Cwp84 as antigen and CT or Freund complete as adjuvant have been performed (Péchiné et al. 2011). The best protection was obtained with the rectal route and CT as adjuvant (40% greater survival in the i.r. immunized group compared to a control group). Surprisingly, this protection was not correlated with circulating anti-Cwp84 antibodies. Then, oral immunization was performed in hamsters with Cwp84 encapsulated in pectin beads for colonic delivery. A similar partial protection (40%) was obtained, with no correlation to systemic antibody response. These results may suggest in the hamster model, the role of other mechanisms of protection in parallel of the circulating antibody response such as innate immunity and mucosal immune response.

*C. difficile* colonization is multifactorial and combination of several surface components in vaccine is likely necessary to obtain a full protection against colonization. A better knowledge of the colonization process and the mucosal immune response against *C. difficile* will improve mucosal vaccine development.



**Figure1:** Mucosal and parenteral immunization strategies against *C. difficile*

## Conclusion

Highly specific and conferring protection, the humoral response is closely associated with the outcome of the infection and the control of recurrences. Several strategies have been developed to prevent or treat CDI (Figure 1).

One approach is based on passive immunizations with various APs, another is to develop vaccines. In both passive and active immunization, the key virulence factors TcdA and TcdB were the first vaccine antigens. Then, surface components of the vegetative cells and the spores were studied as antigens. The first assays have been performed in animal models and have paved the way to development in humans.

Today, bezlotoxumab (Zinplava<sup>TM</sup>) is the only AP against *C. difficile* i.v. administered approved for clinical use and indicated to reduce recurrence of CDI in patients who received SOC antibiotic treatment for CDI and are at high risk of recurrences. The main advantage of passive immunization with specific MAbs consists in its rapidity of protection capable to complement the poor host immune response. However, this strategy is expensive and does not confer a long-term protection.

Vaccines display advantages such as long-term protection but depend on the faculty of the host to develop an immune response. It is well known that immune response is impaired in elderly who are particularly at risk of CDI. Several parenteral vaccines targeting both toxins TcdA and TcdB are tested in clinical trials (2 in phase III). It is likely that parenteral toxin vaccines will be approved soon for human use.

The mucosal and systemic immune responses have both their role in the protection against CDI. Mucosal immunization displays advantages such as the local induction of an innate and adaptive immune response. Several assays have been performed in animal models either with toxin antigens or colonization factor antigens. A phase I clinical trial has been completed with bacillus spores expressing a toxin fragment and a spore protein. These promising assays should be confirmed. Surface components of the vegetative cells have also lead to promising results in animal models. However, a combination of various colonization factors seems necessary to lead to full protection. In addition, the combination of toxin antigens with colonization factors antigens has the advantage to inhibit the two steps of the pathogenic process, colonization and toxin release. Future research should focus on development of novel

immunologic strategies including systemic and mucosal vaccines targeting both virulence and colonization factors.

AP	Clinical trial/Sponsor	Mode of administration	Outcome measures	Results	References ClinicalTrials.gov
Fully HuMAbs	Phase I CDA1 Healthy subjects	Single i.v. injection different doses: 0.3, 1, 5, 10 and 20 mg/kg	Safety PK	No serious adverse effect No HAHA Half-life 25.3 to 31.8 days	Taylor et al. 2008
CDA1 (MK-3415, actoxumab) : anti RBD of TcdA	Phase II CDA1 CDI patients	Single i.v. injection (10mg/kg) with SOC in CDI patients vs placebo	Recurrence	No significant difference between the two groups	Leav et al. 2010
MDX1388 (MK- 6072, bezlotoxumab, Zinplava™) : anti RBD of TcdA	Phase II CDA1, MDX1388. CDI patients Univ of Massachusetts- Medarex	Single i.v. injection of CDA1 + MDX1388 (10mg/kg each) with SOC in CDI patients vs placebo	Recurrence	Significant lower recurrence rate in treated group vs placebo (7% vs 25%)	NCT00350298 Lowy et al. 2010
	Phase III MODIFY I* CDI patients ≥18 years MK-3415 (CDA1) MK-6072 (MDX1388) Merck Sharp&Dohme (MSD)	Four arm study in CDI patients with SOC CDA1 (10mg/kg) MDX1388 (10 mg/kg) CDA1+MDX1388 (10 mg/kg each) vs placebo	Recurrence	Significant lower recurrence rate vs placebo with: MDX1388 (17% vs 28%) CDA1+MDX1388 (16% vs 28%)	NCT01241552
	Phase III MODIFY II (completed). CDI patients ≥18 years MK-3415 (CDA1) MK-6072 (MDX1388) MSD	Three arm study in CDI patients with SOC MDX1388 (10 mg/kg) CDA1+MDX1388 (10 mg/kg each) vs Placebo	Recurrence	Significant lower recurrence rate vs placebo with: MDX1388 (16% vs 26%) CDA1+MDX1388 (15% vs 26%. Addition of CDA1 did not improve efficacy.	NCT01513239 Wilcox et al. 2017
	Phase III MODIFY III (not yet recruiting) MK-6072 MSD	Single infusion MK-6072 Children with CDI 1-17 y ears with SOC vs placebo	Safety Tolerability PK		NCT03182907

AP: antibody-based product. SOC: standard of care antibiotic treatment. PK: pharmacokinetics. HAHA: anti human human antibody. \* discontinued for CDA1

Table 1: Passive immunization strategies : Antibody-based products in clinical development

<b>Vaccine Sponsor</b>	<b>Clinical trial</b>	<b>Mode of administration</b>	<b>Outcome measures</b>	<b>Results</b>	<b>References</b> ClinicalTrials.gov
Highly purified formalin inactivated full length TcdA and TcdB, alum adjuvanted  ACAM-CDIFF™ Acambis puis CDIFFENSE™ Sanofi-Pasteur	Phase I (completed) Healthy adult volunteers (18-55 years) and healthy elderly subjects (≥ 65 years)	i.m. injection (Days 0, 28 and 56 or 0, 28) of different formulations of vaccine (low, medium, high-doses) alum adjuvanted vs placebo vaccine	Safety Immunogeni-city Tolerability	No safety concerns 100% seroconversion in volunteers 18-55 years for TcdA. Lower seroconversion rate for TcdB.	NCT00127803 NCT00214461 NCT00772954 NCT01896830 Greenberg et al. 2012
	Phase II for therapeutic use (completed) 116 Subjects with first CDI treated SOC (18-85 years)	i.m. injection (Days 0, 28 and 56 or 0, 28) of different formulations of CDIFF (low and high dose with adjuvant, high dose without adjuvant) vs placebo (4 arms)	Recurrence Safety Immunogeni-city	No results posted	NCT00772343
	Phase II for prophylactic use (completed) Subjects (40-75 years) at risk of CDI	i.m. 3 dose injection of either one of 4 different formulations (with and without adjuvant) vs placebo on one of 3 different schedules (7 arms)	Safety Immunogeni-city Efficacy against primary CDI	No safety concerns Good immunogenicity	NCT01230957 de Bruyn et al. 2016
	Phase III (recruiting) Subjects at risk of CDI ≥50 years	i.m. 3 dose injection (Days 0, 7 30) vs placebo	Efficacy against primary CDI Immunogeni-city, safety	No results posted	NCT01887912
Genetically modified full length TcdA and	Phase I (completed) Healthy adult volunteers (50-85 years)	i.m. 3 dose injection different doses with/without adjuvant (alum) vs placebo	Safety Immunogeni-city	Generally safe and well tolerated No clear dose response Good immunogenicity	NCT01706367 NCT02052726 Sheldon et al. 2016



TcdB toxoids Pfizer	Phase II (completed) Healthy adult volunteers (50-85 years)	i.m. 3 doses (Day 1, 8, 30) high dose, low dose vs placebo (3 arms)	Safety Tolerability Immune response	Generally safe and well tolerated	NCT02117570
	Phase II (ongoing but not recruiting participants) Healthy adults 65-85 years	i.m. 3 doses on 1 of 2 schedule vs placebo (6 arms)	Safety Tolerability Immune response	No results posted	NCT02561195
	Phase III (recruiting participants) Adults $\geq$ 50 years	Vaccine vs placebo (2 arms)	Efficacy : CDI and recurrence	No results posted	NCT03090191
Recombinant fusion protein consisting of truncated TcdA and TcdB  VLA84 (formerly IC84 Intercell ) Valneva Austria	Phase Ia/Ib (completed) Ia Healthy subjects 18-65 years Ib elderly $\geq$ 65 years	i.m. 4 injections (Day 0, 7, 28, 56) of two different doses with or without adjuvant (alum)	Safety, Immunogeni -city, Dose response	Good safety and tolerability Highly immunogenic for TcdA and TcdB	NCT01296386 Bezay et al 2016
	Phase II (completed) 500 healthy adults $\geq$ 50 years	i.m. injections (Day 0, 7, 28) different doses with or without alum vs placebo	Dose confirmation, Immunogeni -city, safety	No results posted	NCT02316470
CDVAX Inactivated Bacillus spores expressing a toxoid antigen and a spore colonization factor Royal Holloway Univ. Cutting S.M.	Phase I (terminated) Healthy adults 18-50 years	Oral vaccine	Safety, Mucosal and systemic immunogeni city	No results posted	NCT02991417

SOC: standard of care antibiotic treatment.

Table 2: Vaccines in clinical development

## References

- Andersen KK, Strokappe NM, Hultberg A, Truusalu K, Smidt I, Mikelsaar R-H, Mikelsaar M, Verrips T, Hammarström L, Marcotte H (2015) Neutralization of *Clostridium difficile* Toxin B Mediated by Engineered Lactobacilli That Produce Single-Domain Antibodies. *Infect Immun* 84:395–406. doi: 10.1128/IAI.00870-15
- Anosova NG, Brown AM, Li L, Liu N, Cole LE, Zhang J, Mehta H, Kleanthous H (2013) Systemic antibody responses induced by a two-component *Clostridium difficile* toxoid vaccine protect against C. difficile-associated disease in hamsters. *J Med Microbiol* 62:1394–1404. doi: 10.1099/jmm.0.056796-0
- Anosova NG, Cole LE, Li L, Zhang J, Brown AM, Mundle S, Zhang J, Ray S, Ma F, Garrone P, Bertramini N, Kleanthous H, Anderson SF (2015) A Combination of Three Fully Human Toxin A- and Toxin B-Specific Monoclonal Antibodies Protects against Challenge with Highly Virulent Epidemic Strains of *Clostridium difficile* in the Hamster Model. *Clin Vaccine Immunol* 22:711–725. doi: 10.1128/CAI.00763-14
- Aronsson B, Granström M, Möllby R, Nord CE (1985) Serum antibody response to *Clostridium difficile* toxins in patients with *Clostridium difficile* diarrhoea. *Infection* 13:97–101.
- Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR, Kansau I, Collignon A, Minton NP (2013) The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PloS One* 8:e73026. doi: 10.1371/journal.pone.0073026
- Babcock GJ, Broering TJ, Hernandez HJ, Mandell RB, Donahue K, Boatright N, Stack AM, Lowy I, Graziano R, Molrine D, Ambrosino DM, Thomas WD (2006) Human Monoclonal Antibodies Directed against Toxins A and B Prevent *Clostridium difficile*-Induced Mortality in Hamsters. *Infect Immun* 74:6339–6347. doi: 10.1128/IAI.00982-06
- Baliban SM, Michael A, Shammassian B, Mudakha S, Khan AS, Cocklin S, Zentner I, Latimer BP, Bouillaut L, Hunter M, Marx P, Sardesai NY, Welles SL, Jacobson JM, Weiner DB, Kutzler MA (2014) An optimized, synthetic DNA vaccine encoding the toxin A and toxin B receptor binding domains of *Clostridium difficile* induces protective antibody responses in vivo. *Infect Immun* 82:4080–4091. doi: 10.1128/IAI.01950-14
- Barketi-Klai A, Hoys S, Lambert-Bordes S, Collignon A, Kansau I (2011) Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. *J Med Microbiol* 60:1155–1161. doi: 10.1099/jmm.0.029553-0
- Batah J, Denève-Larrazet C, Jolivot P-A, Kuehne S, Collignon A, Marvaud J-C, Kansau I (2016) *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in epithelial cells. *Anaerobe* 38:116–124. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.01.002
- Batah J, Kobeissy H, Pham PTB, Denève-Larrazet C, Kuehne S, Collignon A, Janoir-Jouveshomme C, Marvaud J-C, Kansau I (2017) *Clostridium difficile* flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins. *Sci Rep* 7:3256. doi: 10.1038/s41598-017-03621-z

- Belyi IF, Varfolomeeva NA (2003) Construction of a fusion protein carrying antigenic determinants of enteric clostridial toxins. *FEMS Microbiol Lett* 225:325–329.
- Best EL, Freeman J, Wilcox MH (2012) Models for the study of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 3:145–167. doi: 10.4161/gmic.19526
- Bézay N, Ayad A, Dubischar K, Firbas C, Hochreiter R, Kiermayr S, Kiss I, Pinl F, Jilma B, Westritschnig K (2016) Safety, immunogenicity and dose response of VLA84, a new vaccine candidate against *Clostridium difficile*, in healthy volunteers. *Vaccine* 34:2585–2592. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.098
- Brock JH, Arzabe R, Piñeiro A, Olivito AM (1977) The effect of trypsin and chymotrypsin on the bactericidal activity and specific antibody activity of bovine colostrum. *Immunology* 32:207–213.
- Broecker F, Hanske J, Martin CE, Baek JY, Wahlbrink A, Wojcik F, Hartmann L, Rademacher C, Anish C, Seeberger PH (2016a) Multivalent display of minimal *Clostridium difficile* glycan epitopes mimics antigenic properties of larger glycans. *Nat Commun* 7:11224. doi: 10.1038/ncomms11224
- Broecker F, Martin CE, Wegner E, Mattner J, Baek JY, Pereira CL, Anish C, Seeberger PH (2016b) Synthetic Lipoteichoic Acid Glycans Are Potential Vaccine Candidates to Protect from *Clostridium difficile* Infections. *Cell Chem Biol* 23:1014–1022. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.07.009
- Bruxelle J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S (2016) Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models. *Anaerobe* 37:78–84. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.010
- Cafardi V, Biagini M, Martinelli M, Leuzzi R, Rubino JT, Cantini F, Norais N, Scarselli M, Serruto D, Unnikrishnan M (2013) Identification of a novel zinc metalloprotease through a global analysis of *Clostridium difficile* extracellular proteins. *PloS One* 8:e81306. doi: 10.1371/journal.pone.0081306
- Calabi E, Calabi F, Phillips AD, Fairweather NF (2002) Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* 70:5770–5778.
- Carter GP, Chakravorty A, Pham Nguyen TA, Mileto S, Schreiber F, Li L, Howarth P, Clare S, Cunningham B, Sambol SP, Cheknis A, Figueroa I, Johnson S, Gerding D, Rood JI, Dougan G, Lawley TD, Lyras D (2015) Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *mBio* 6:e00551. doi: 10.1128/mBio.00551-15
- Cerquetti M, Pantosti A, Stefanelli P, Mastrantonio P (1992) Purification and characterization of an immunodominant 36 kDa antigen present on the cell surface of *Clostridium difficile*. *Microb Pathog* 13:271–279.
- Chapetón Montes D, Collignon A, Janoir C (2013) Influence of environmental conditions on the expression and the maturation process of the *Clostridium difficile* surface associated protease Cwp84. *Anaerobe* 19:79–82. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.12.004

- Chen K, Cerutti A (2010) Vaccination Strategies to Promote Mucosal Antibody Responses. *Immunity* 33:479–491. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.013
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, Society for Healthcare Epidemiology of America, Infectious Diseases Society of America (2010) Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 31:431–455. doi: 10.1086/651706
- Corthier G, Muller MC, Wilkins TD, Lyerly D, L'Haridon R (1991) Protection against experimental pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 59:1192–1195.
- Cox AD, St Michael F, Aubry A, Cairns CM, Strong PCR, Hayes AC, Logan SM (2013) Investigating the candidacy of a lipoteichoic acid-based glycoconjugate as a vaccine to combat *Clostridium difficile* infection. *Glycoconj J* 30:843–855. doi: 10.1007/s10719-013-9489-3
- Dang THT, de la Riva L, Fagan RP, Storck EM, Heal WP, Janoir C, Fairweather NF, Tate EW (2010) Chemical probes of surface layer biogenesis in *Clostridium difficile*. *ACS Chem Biol* 5:279–285. doi: 10.1021/cb9002859
- Davies NL, Compson JE, MacKenzie B, O'Dowd VL, Oxbrow AKF, Heads JT, Turner A, Sarkar K, Dugdale SL, Jairaj M, Christodoulou L, Knight DEO, Cross AS, Hervé KJM, Tyson KL, Hailu H, Doyle CB, Ellis M, Kriek M, Cox M, Page MJT, Moore AR, Lightwood DJ, Humphreys DP (2013) A Mixture of Functionally Oligoclonal Humanized Monoclonal Antibodies That Neutralize *Clostridium difficile* TcdA and TcdB with High Levels of In Vitro Potency Shows In Vivo Protection in a Hamster Infection Model. *Clin Vaccine Immunol* 20:377–390. doi: 10.1128/CVI.00625-12
- de Bruyn G, Saleh J, Workman D, Pollak R, Elinoff V, Fraser NJ, Lefebvre G, Martens M, Mills RE, Nathan R, Trevino M, van Cleeff M, Foglia G, Ozol-Godfrey A, Patel DM, Pietrobon PJ, Gesser R, H-030-012 Clinical Investigator Study Team (2016) Defining the optimal formulation and schedule of a candidate toxoid vaccine against *Clostridium difficile* infection: A randomized Phase 2 clinical trial. *Vaccine* 34:2170–2178. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.028
- de Rham O, Isliker H (1977) Proteolysis of bovine immunoglobulins. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 55:61–69.
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ (2014) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 20 Suppl 2:1–26. doi: 10.1111/1469-0691.12418
- Dingle T, Wee S, Mulvey GL, Greco A, Kitova EN, Sun J, Lin S, Klassen JS, Palcic MM, Ng KKS, Armstrong GD (2008) Functional properties of the carboxy-terminal host cell-binding domains of the two toxins, TcdA and TcdB, expressed by *Clostridium difficile*. *Glycobiology* 18:698–706. doi: 10.1093/glycob/cwn048

- Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD (2011) Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun* 79:4061–4067. doi: 10.1128/IAI.05305-11
- Diraviyam T, He J-X, Chen C, Zhao B, Michael A, Zhang X (2016) Effect of passive immunotherapy against *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Immunotherapy* 8:649–663. doi: 10.2217/imt.16.8
- Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, Kelly CP (2004) Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:237–242. doi: 10.1016/j.femsim.2004.03.007
- Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, Berger P, Petit A, De Chevigny A, Jean-Pierre H, Nebbad B, Camiade S, Meckenstock R, Lalande V, Marchandin H, Barbut F (2015) Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect* 3:12–17. doi: 10.1016/j.nmni.2014.10.003
- Eidhin DN, Ryan AW, Doyle RM, Walsh JB, Kelleher D (2006) Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, slpA, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 55:69–83. doi: 10.1099/jmm.0.46204-0
- Fagarasan S, Honjo T (2003) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3:63–72. doi: 10.1038/nri982
- Fernie DS, Thomson RO, Batty I, Walker PD (1983) Active and passive immunization to protect against antibiotic associated caecitis in hamsters. *Dev Biol Stand* 53:325–332.
- Ganeshapillai J, Vinogradov E, Rousseau J, Weese JS, Monteiro MA (2008) *Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units. *Carbohydr Res* 343:703–710. doi: 10.1016/j.carres.2008.01.002
- Gardiner DF, Rosenberg T, Zaharatos J, Franco D, Ho DD (2009) A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Vaccine* 27:3598–3604. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.058
- Ghose C, Eugenis I, Edwards AN, Sun X, McBride SM, Ho DD (2016a) Immunogenicity and protective efficacy of *Clostridium difficile* spore proteins. *Anaerobe* 37:85–95. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.12.001
- Ghose C, Eugenis I, Sun X, Edwards AN, McBride SM, Pride DT, Kelly CP, Ho DD (2016b) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein FliC. *Emerg Microbes Infect* 5:e8. doi: 10.1038/emi.2016.8
- Ghose C, Verhagen JM, Chen X, Yu J, Huang Y, Chenesseau O, Kelly CP, Ho DD (2013) Toll-like receptor 5-dependent immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein vaccine containing the nontoxic domains of *Clostridium difficile* toxins A and B and *Salmonella enterica* serovar typhimurium flagellin in a mouse model of *Clostridium difficile* disease. *Infect Immun* 81:2190–2196. doi: 10.1128/IAI.01074-12

Giannasca PJ, Zhang ZX, Lei WD, Boden JA, Giel MA, Monath TP, Thomas WD Jr (1999) Serum antitoxin antibodies mediate systemic and mucosal protection from *Clostridium difficile* disease in hamsters. *Infect Immun* 67:527–538.

Greenberg RN, Marbury TC, Foglia G, Warny M (2012) Phase I dose finding studies of an adjuvanted *Clostridium difficile* toxoid vaccine. *Vaccine* 30:2245–2249. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.065

Guo S, Yan W, McDonough SP, Lin N, Wu KJ, He H, Xiang H, Yang M, Moreira MAS, Chang Y-F (2015) The recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine induces protection against *C. difficile* spore challenge in a mouse model. *Vaccine* 33:1586–1595. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.02.006

Hennequin C, Janoir C, Barc M-C, Collignon A, Karjalainen T (2003) Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiol Read Engl* 149:2779–2787.

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. *Microbiol Read Engl* 147:87–96.

Hensbergen PJ, Klychnikov OI, Bakker D, van Winden VJ, Ras N, Kemp AC, Cordfunke RA, Dragan I, Deelder AM, Kuijper EJ, others (2014) A novel secreted metalloprotease (CD2830) from *Clostridium difficile* cleaves specific proline sequences in LPXTG cell surface proteins. *Mol Cell Proteomics* 13:1231–1244.

Hernandez LD, Racine F, Xiao L, DiNunzio E, Hairston N, Sheth PR, Murgolo NJ, Therien AG (2015) Broad coverage of genetically diverse strains of *Clostridium difficile* by actoxumab and bezlotoxumab predicted by in vitro neutralization and epitope modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1052–1060. doi: 10.1128/AAC.04433-14

Hong HA, Hitri K, Hosseini S, Kotowicz N, Bryan D, Mawas F, Wilkinson AJ, van Broekhoven A, Kearsley J, Cutting SM (2017) Mucosal Antibodies to the C Terminus of Toxin A Prevent Colonization of *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. doi: 10.1128/IAI.01060-16

Islam J, Taylor AL, Rao K, Huffnagle G, Young VB, Rajkumar C, Cohen J, Papatheodorou P, Aronoff DM, Llewelyn MJ (2014) The role of the humoral immune response to *Clostridium difficile* toxins A and B in susceptibility to *C. difficile* infection: a case-control study. *Anaerobe* 27:82–86. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.03.011

Jank T, Aktories K (2008) Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol* 16:222–229. doi: 10.1016/j.tim.2008.01.011

Janoir C (2016) Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* 37:13–24. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.009

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. doi: 10.1128/JB.00578-07

- Jin K, Wang S, Zhang C, Xiao Y, Lu S, Huang Z (2013) Protective antibody responses against *Clostridium difficile* elicited by a DNA vaccine expressing the enzymatic domain of toxin B. *Hum Vaccines Immunother* 9:63–73. doi: 10.4161/hv.22434
- Johal SS, Lambert CP, Hammond J, James PD, Borriello SP, Mahida YR (2004) Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Clin Pathol* 57:973–979. doi: 10.1136/jcp.2003.015875
- Johnson S, Gerding DN, Janoff EN (1992) Systemic and mucosal antibody responses to toxin A in patients infected with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 166:1287–1294.
- Kandalaft H, Hussack G, Aubry A, Faassen H van, Guan Y, Arbabi-Ghahroudi M, MacKenzie R, Logan SM, Tanha J (2015) Targeting surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against *Clostridium difficile*-associated disease. *Appl Microbiol Biotechnol* 1–14. doi: 10.1007/s00253-015-6594-1
- Karczewski J, Zorman J, Wang S, Mizejewski M, Xie J, Soring K, Petrescu I, Rogers I, Thiriot DS, Cook JC, Chamberlin M, Xoconostle RF, Nahas DD, Joyce JG, Bodmer J-L, Heinrichs JH, Secore S (2014) Development of a recombinant toxin fragment vaccine for *Clostridium difficile* infection. *Vaccine* 32:2812–2818. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.026
- Karjalainen T, Waligora-Dupriet AJ, Cerquetti M, Spigaglia P, Maggioni A, Mauri P, Mastrantonio P (2001) Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 69:3442–3446. doi: 10.1128/IAI.69.5.3442-3446.2001
- Kelly CP, Pothoulakis C, Orellana J, LaMont JT (1992) Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. *Gastroenterology* 102:35–40.
- Khan KH (2013) DNA vaccines: roles against diseases. *Germs* 3:26–35. doi: 10.11599/germs.2013.1034
- Kim PH, Iaconis JP, Rolfe RD (1987) Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocectitis and transfer of protection to infant hamsters. *Infect Immun* 55:2984–2992.
- Kink JA, Williams JA (1998) Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of C. difficile-associated disease in a hamster model of infection. *Infect Immun* 66:2018–2025.
- Kirby JM, Ahern H, Roberts AK, Kumar V, Freeman Z, Acharya KR, Shone CC (2009) Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. *J Biol Chem* 284:34666–34673. doi: 10.1074/jbc.M109.051177
- Kotloff KL, Wasserman SS, Losonsky GA, Thomas W Jr, Nichols R, Edelman R, Bridwell M, Monath TP (2001) Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. *Infect Immun* 69:988–995. doi: 10.1128/IAI.69.2.988-995.2001

- Kovacs-Simon A, Leuzzi R, Kasendra M, Minton N, Titball RW, Michell SL (2014) Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 210:274–284. doi: 10.1093/infdis/jiu070
- Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP (2010) The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 467:711–713. doi: 10.1038/nature09397
- Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP (2014) Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *J Infect Dis* 209:83–86. doi: 10.1093/infdis/jit426
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2000) Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 342:390–397. doi: 10.1056/NEJM200002103420604
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2001) Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet Lond Engl* 357:189–193. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03592-3
- Lavelle EC (2005) Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci CMLS* 62:2750–2770. doi: 10.1007/s00018-005-5290-1
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM (2016) Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40:95–99. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008
- Leav BA, Blair B, Leney M, Knauber M, Reilly C, Lowy I, Gerding DN, Kelly CP, Katchar K, Baxter R, Ambrosino D, Molrine D (2010) Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). *Vaccine* 28:965–969. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.144
- Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, MEEK JI, Phipps EC, Wilson LE, Winston LG, Cohen JA, Limbago BM, Fridkin SK, Gerding DN, McDonald LC (2015) Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *N Engl J Med* 372:825–834. doi: 10.1056/NEJMoa1408913
- Leung DYM, Kelly CP, Boguniewicz M, Pothoulakis C, LaMont JT, Flores A (1991) Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J Pediatr* 118:633–637. doi: 10.1016/S0022-3476(05)83393-1
- Leuzzi R, Spencer J, Buckley A, Brettoni C, Martinelli M, Tulli L, Marchi S, Luzzi E, Irvine J, Candlish D, Veggi D, Pansegrau W, Fiaschi L, Savino S, Swennen E, Cakici O, Oviedo-Orta E, Giraldi M, Baudner B, D’Urzo N, Maione D, Soriani M, Rappuoli R, Pizza M, Douce GR, Scarselli M (2013) Protective efficacy induced by recombinant *Clostridium difficile* toxin fragments. *Infect Immun* 81:2851–2860. doi: 10.1128/IAI.01341-12
- Libby JM, Jortner BS, Wilkins TD (1982) Effects of the two toxins of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated cecitis in hamsters. *Infect Immun* 36:822–829.



Libby JM, Wilkins TD (1982) Production of antitoxins to two toxins of *Clostridium difficile* and immunological comparison of the toxins by cross-neutralization studies. *Infect Immun* 35:374–376.

Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, Nichol G, Thomas WD Jr, Leney M, Sloan S, Hay CA, Ambrosino DM (2010) Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 362:197–205. doi: 10.1056/NEJMoa0907635

Lyerly DDM, Johnson JL, Frey SM, Wilkins TD (1990) Vaccination against lethal *Clostridium difficile* enterocolitis with a nontoxic recombinant peptide of toxin A. *Curr Microbiol* 21:29–32. doi: 10.1007/BF02090096

Lyerly DM, Bostwick EF, Binion SB, Wilkins TD (1991) Passive immunization of hamsters against disease caused by *Clostridium difficile* by use of bovine immunoglobulin G concentrate. *Infect Immun* 59:2215–2218.

Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN, Rood JI (2009) Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458:1176–1179. doi: 10.1038/nature07822

Maldarelli GA, Matz H, Gao S, Chen K, Hamza T, Yfantis HG, Feng H, Sonnenberg MS (2016) Pilin Vaccination Stimulates Weak Antibody Responses and Provides No Protection in a C57Bl/6 Murine Model of Acute *Clostridium difficile* Infection. *J Vaccines Vaccin*. doi: 10.4172/2157-7560.1000321

Martin CE, Broecker F, Oberli MA, Komor J, Mattner J, Anish C, Seeberger PH (2013) Immunological evaluation of a synthetic *Clostridium difficile* oligosaccharide conjugate vaccine candidate and identification of a minimal epitope. *J Am Chem Soc* 135:9713–9722. doi: 10.1021/ja401410y

Mattila E, Anttila V-J, Broas M, Marttila H, Poukka P, Kuusisto K, Pusa L, Sammalkorpi K, Dabek J, Koivurova O-P, Vähätalo M, Moilanen V, Widenius T (2008) A randomized, double-blind study comparing *Clostridium difficile* immune whey and metronidazole for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: efficacy and safety data of a prematurely interrupted trial. *Scand J Infect Dis* 40:702–708. doi: 10.1080/00365540801964960

Maynard-Smith M, Ahern H, McGlashan J, Nugent P, Ling R, Denton H, Coxon R, Landon J, Roberts A, Shone C (2014) Recombinant antigens based on toxins A and B of *Clostridium difficile* that evoke a potent toxin-neutralising immune response. *Vaccine* 32:700–705. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.099

Mizrahi A, Collignon A, Péchiné S (2014) Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: state of the art. *Anaerobe* 30:210–219. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.07.006

Monteiro MA (2016) The Design of a *Clostridium difficile* Carbohydrate-Based Vaccine. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1403:397–408. doi: 10.1007/978-1-4939-3387-7\_21

Monteiro MA, Ma Z, Bertolo L, Jiao Y, Arroyo L, Hodgins D, Mallozzi M, Vedantam G, Sagermann M, Sundsmo J, Chow H (2013) Carbohydrate-based *Clostridium difficile* vaccines. *Expert Rev Vaccines* 12:421–431. doi: 10.1586/erv.13.9

- Negm OH, MacKenzie B, Hamed MR, Ahmad O a. J, Shone CC, Humphreys DP, Ravi Acharya K, Loscher CE, Marszalowska I, Lynch M, Wilcox MH, Monaghan TM (2017) Protective antibodies against *Clostridium difficile* are present in intravenous immunoglobulin and are retained in humans following its administration. Clin Exp Immunol n/a-n/a. doi: 10.1111/cei.12946
- Ní Eidhin DB, O'Brien JB, McCabe MS, Athié-Morales V, Kelleher DP (2008) Active immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using surface-layer protein. FEMS Immunol Med Microbiol 52:207–218. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00363.x
- Oberli MA, Hecht M-L, Bindschädler P, Adibekian A, Adam T, Seeberger PH (2011) A possible oligosaccharide-conjugate vaccine candidate for *Clostridium difficile* is antigenic and immunogenic. Chem Biol 18:580–588. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.03.009
- O'Brien JB, McCabe MS, Athié-Morales V, McDonald GSA, Ní Eidhin DB, Kelleher DP (2005) Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins. FEMS Microbiol Lett 246:199–205. doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.005
- Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp TR, Aktories K (2011) Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). Proc Natl Acad Sci U S A 108:16422–16427. doi: 10.1073/pnas.1109772108
- Péchiné S, Collignon A (2016) Immune responses induced by *Clostridium difficile*. Anaerobe 41:68–78. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.04.014
- Péchiné S, Denève C, Le Monnier A, Hoys S, Janoir C, Collignon A (2011) Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. FEMS Immunol Med Microbiol 63:73–81. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00832.x
- Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, Collignon A (2005a) Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol 54:193–196.
- Péchiné S, Hennequin C, Boursier C, Hoys S, Collignon A (2013) Immunization using GroEL decreases *Clostridium difficile* intestinal colonization. PloS One 8:e81112. doi: 10.1371/journal.pone.0081112
- Péchiné S, Janoir C, Boureau H, Gleizes A, Tsapis N, Hoys S, Fattal E, Collignon A (2007) Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. Vaccine 25:3946–3954. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.055
- Péchiné S, Janoir C, Collignon A (2005b) Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. J Clin Microbiol 43:5018–5025. doi: 10.1128/JCM.43.10.5018-5025.2005
- Péchiné S, Janoir C, Collignon A (2017) Emerging monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* infection. Expert Opin Biol Ther 17:415–427. doi: 10.1080/14712598.2017.1300655

Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR (1997) Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* 65:1402–1407.

Permpoonpattana P, Hong HA, Phetcharaburanin J, Huang J-M, Cook J, Fairweather NF, Cutting SM (2011) Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infect Immun* 79:2295–2302. doi: 10.1128/IAI.00130-11

Popoff MR, Geny B (2011) Rho/Ras-GTPase-dependent and -independent activity of clostridial glucosylating toxins. *J Med Microbiol* 60:1057–1069. doi: 10.1099/jmm.0.029314-0

Qiu H, Cassan R, Johnstone D, Han X, Joyee AG, McQuoid M, Masi A, Merluza J, Hrehorak B, Reid R, Kennedy K, Tighe B, Rak C, Leonhardt M, Dupas B, Saward L, Berry JD, Nykiforuk CL (2016) Novel *Clostridium difficile* Anti-Toxin (TcdA and TcdB) Humanized Monoclonal Antibodies Demonstrate In Vitro Neutralization across a Broad Spectrum of Clinical Strains and In Vivo Potency in a Hamster Spore Challenge Model. *PLoS One* 11:e0157970. doi: 10.1371/journal.pone.0157970

Roberts A, McGlashan J, Al-Abdulla I, Ling R, Denton H, Green S, Coxon R, Landon J, Shone C (2012) Development and Evaluation of an Ovine Antibody-Based Platform for Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Infect Immun* 80:875–882. doi: 10.1128/IAI.05684-11

Romano MR, Leuzzi R, Cappelletti E, Tontini M, Nilo A, Proietti D, Berti F, Costantino P, Adamo R, Scarselli M (2014) Recombinant *Clostridium difficile* toxin fragments as carrier protein for PSII surface polysaccharide preserve their neutralizing activity. *Toxins* 6:1385–1396. doi: 10.3390/toxins6041385

Ryan A, Lynch M, Smith SM, Amu S, Nel HJ, McCoy CE, Dowling JK, Draper E, O'Reilly V, McCarthy C, O'Brien J, Ni Eidhin D, O'Connell MJ, Keogh B, Morton CO, Rogers TR, Fallon PG, O'Neill LA, Kelleher D, Loscher CE (2011) A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. *PLoS Pathog* 7:e1002076. doi: 10.1371/journal.ppat.1002076

Ryan ET, Butterson JR, Smith RN, Carroll PA, Crean TI, Calderwood SB (1997) Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. *Infect Immun* 65:2941–2949.

Saade F, Petrovsky N (2012) Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 11:189–209. doi: 10.1586/erv.11.188

Sauerborn M, Leukel P, von Eichel-Streiber C (1997) The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality. *FEMS Microbiol Lett* 155:45–54.

Savelkoul HFJ, Ferro VA, Strioga MM, Schijns VEJC (2015) Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines. *Vaccines* 3:148–171. doi: 10.3390/vaccines3010148

- Schmidt DJ, Beamer G, Tremblay JM, Steele JA, Kim HB, Wang Y, Debatis M, Sun X, Kashentseva EA, Dmitriev IP, Curiel DT, Shoemaker CB, Tzipori S (2016) A Tetraspecific VHH-Based Neutralizing Antibody Modifies Disease Outcome in Three Animal Models of *Clostridium difficile* Infection. *Clin Vaccine Immunol* CVI 23:774–784. doi: 10.1128/CVI.00730-15
- Schwan C, Kruppke AS, Nölke T, Schumacher L, Koch-Nolte F, Kudryashev M, Stahlberg H, Aktories K (2014) *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2313–2318. doi: 10.1073/pnas.1311589111
- Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt W-D, Wehland J, Aktories K (2009) *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog* 5:e1000626. doi: 10.1371/journal.ppat.1000626
- Secore S, Wang S, Dougherty J, Xie J, Miezeiewski M, Rustandi RR, Horton M, Xoconostle R, Wang B, Lancaster C, Kristopeit A, Wang S-C, Christanti S, Vitelli S, Gentile M-P, Goerke A, Skinner J, Strable E, Thiriot DS, Bodmer J-L, Heinrichs JH (2017) Development of a Novel Vaccine Containing Binary Toxin for the Prevention of *Clostridium difficile* Disease with Enhanced Efficacy against NAP1 Strains. *PloS One* 12:e0170640. doi: 10.1371/journal.pone.0170640
- Senoh M, Iwaki M, Yamamoto A, Kato H, Fukuda T, Shibayama K (2015) Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to human intestinal cells after treatment with serum and intestinal fluid isolated from mice immunized with nontoxigenic *C. difficile* membrane fraction. *Microb Pathog* 81:1–5. doi: 10.1016/j.micpath.2015.03.001
- Seregin SS, Aldhamen YA, Rastall DPW, Godbehere S, Amalfitano A (2012) Adenovirus-based vaccination against *Clostridium difficile* toxin A allows for rapid humoral immunity and complete protection from toxin A lethal challenge in mice. *Vaccine* 30:1492–1501. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.064
- Sheldon E, Kitchin N, Peng Y, Eiden J, Gruber W, Johnson E, Jansen KU, Pride MW, Pedneault L (2016) A phase 1, placebo-controlled, randomized study of the safety, tolerability, and immunogenicity of a *Clostridium difficile* vaccine administered with or without aluminum hydroxide in healthy adults. *Vaccine* 34:2082–2091. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.010
- Shields K, Araujo-Castillo RV, Theethira TG, Alonso CD, Kelly CP (2015) Recurrent *Clostridium difficile* infection: From colonization to cure. *Anaerobe* 34:59–73. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.012
- Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D, Keates S, Maroo S, Pothoulakis C, Giannasca PJ, Lee CK, Warny M, Monath TP, Kelly CP (2005) *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 128:764–770.
- Spencer J, Leuzzi R, Buckley A, Irvine J, Candlish D, Scarselli M, Douce GR (2014) Vaccination against *Clostridium difficile* using toxin fragments: Observations and analysis in animal models. *Gut Microbes* 5:225–232. doi: 10.4161/gmic.27712

Stevenson E, Minton NP, Kuehne SA (2015) The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. *Trends Microbiol* 23:275–282. doi: 10.1016/j.tim.2015.01.004

Tasteyre A, Barc MC, 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. doi: 10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001

Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, Barc MC (2000) Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (fliC) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol* 38:3179–3186.

Taylor CP, Tummala S, Molrine D, Davidson L, Farrell RJ, Lembo A, Hibberd PL, Lowy I, Kelly CP (2008) 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* 26:3404–3409. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.042

Tian J-H, Fuhrmann SR, Kluepfel-Stahl S, Carman RJ, Ellingsworth L, Flyer DC (2012) A novel fusion protein containing the receptor binding domains of *C. difficile* toxin A and toxin B elicits protective immunity against lethal toxin and spore challenge in preclinical efficacy models. *Vaccine* 30:4249–4258. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.04.045

Tian J-H, Glenn G, Flyer D, Zhou B, Liu Y, Sullivan E, Wu H, Cummings JF, Ellingsworth L, Smith G (2017) *Clostridium difficile* chimeric toxin receptor binding domain vaccine induced protection against different strains in active and passive challenge models. *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.062

Torres JF, Lyerly DM, Hill JE, Monath TP (1995) Evaluation of formalin-inactivated *Clostridium difficile* vaccines administered by parenteral and mucosal routes of immunization in hamsters. *Infect Immun* 63:4619–4627.

Tulli L, Marchi S, Petracca R, Shaw HA, Fairweather NF, Scarselli M, Soriani M, Leuzzi R (2013) CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen: Collagen binding protein of *Clostridium difficile*. *Cell Microbiol* n/a-n/a. doi: 10.1111/cmi.12139

Unger M, Eichhoff AM, Schumacher L, Strycio M, Menzel S, Schwan C, Alzogaray V, Zylberman V, Seman M, Brandner J, Rohde H, Zhu K, Haag F, Mittrücker H-W, Goldbaum F, Aktories K, Koch-Nolte F (2015) Selection of nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary *Clostridium difficile* toxin CDT. *Sci Rep* 5:7850. doi: 10.1038/srep07850

van Dissel JT, de Groot N, Hensgens CM, Numan S, Kuijper EJ, Veldkamp P, van 't Wout J (2005) Bovine antibody-enriched whey to aid in the prevention of a relapse of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: preclinical and preliminary clinical data. *J Med Microbiol* 54:197–205.

van Dorp SM, Kinross P, Gastmeier P, Behnke M, Kola A, Delmée M, Pavelkovich A, Mentula S, Barbut F, Hajdu A, Ingebretsen A, Pituch H, Macovei IS, Jovanović M, Wiuff C, Schmid D, Olsen KE, Wilcox MH, Suetens C, Kuijper EJ, European *Clostridium difficile* Infection Surveillance Network (ECDIS-Net) on behalf of all participants (2016) Standardised surveillance of *Clostridium difficile* infection in European acute care hospitals: a pilot study,

2013. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30293

Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder RW, Bartlett JG (1983) Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. J Infect Dis 148:93–100.

Voth DE, Ballard JD (2005) *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 18:247–263. doi: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005

Waligora AJ, 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. doi: 10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001

Wang B, Wang S, Rustandi RR, Wang F, Mensch CD, Hong L, Kristopeit A, Secore S, Dornadula G, Kanavage A, Heinrichs JH, Mach H, Blue JT, Thiriot DS (2015) Detecting and preventing reversion to toxicity for a formaldehyde-treated *C. difficile* toxin B mutant. Vaccine 33:252–259. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.032

Wang H, Sun X, Zhang Y, Li S, Chen K, Shi L, Nie W, Kumar R, Tzipori S, Wang J, Savidge T, Feng H (2012) A Chimeric Toxin Vaccine Protects against Primary and Recurrent *Clostridium difficile* Infection. Infect Immun 80:2678–2688. doi: 10.1128/IAI.00215-12

Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmée M (1994) Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. Infect Immun 62:384–389.

Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, Cornely OA, Rahav G, Bouza E, Lee C, Jenkin G, Jensen W, Kim Y-S, Yoshida J, Gabryelski L, Pedley A, Eves K, Tipping R, Guris D, Kartsonis N, Dorr M-B, MODIFY I and MODIFY II Investigators (2017) Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. N Engl J Med 376:305–317. doi: 10.1056/NEJMoa1602615

Wright A, Drudy D, Kyne L, Brown K, Fairweather NF (2008) Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. J Med Microbiol 57:750–756. doi: 10.1099/jmm.0.47532-0

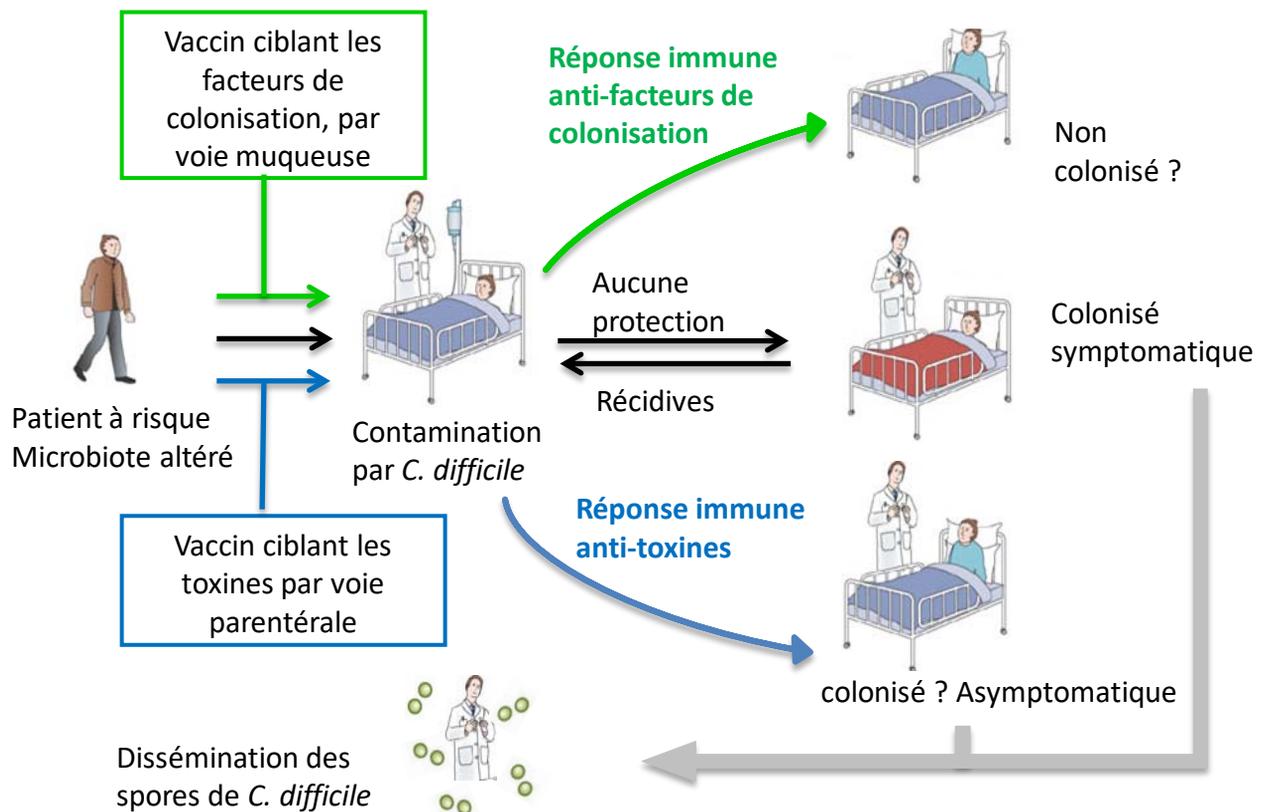
Xiong N, Hu S (2015) Regulation of intestinal IgA responses. Cell Mol Life Sci CMLS 72:2645–2655. doi: 10.1007/s00018-015-1892-4

Yang Z, Schmidt D, Liu W, Li S, Shi L, Sheng J, Chen K, Yu H, Tremblay JM, Chen X, Piepenbrink KH, Sundberg EJ, Kelly CP, Bai G, Shoemaker CB, Feng H (2014) A novel multivalent, single-domain antibody targeting TcdA and TcdB prevents fulminant *Clostridium difficile* infection in mice. J Infect Dis 210:964–972. doi: 10.1093/infdis/jiu196

Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, Ota Y (2013) *Clostridium difficile* flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. Life Sci 92:211–217. doi: 10.1016/j.lfs.2012.11.017

Zhang L, Wang W, Wang S (2015) Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy. Expert Rev Vaccines 14:1509–1523. doi: 10.1586/14760584.2015.1081067

**Travaux  
personnels**



**Figure 17.** Stratégies préventives des infections à *C. difficile*. (adapté de Rupnik et al. Nat Rev Microbiol. 2009)



## Objectifs scientifiques

La nature épidémique des ICD et la sévérité des infections suscitent l'intérêt de développer une stratégie préventive contre *C. difficile* tel qu'un vaccin. Alors qu'un déficit de la réponse immunitaire est un facteur de risque d'ICD, une réponse immunitaire dirigée contre les toxines et les protéines de surface de *C. difficile* semble être corrélée à une protection vis-à-vis de l'infection. De nombreuses stratégies préventives d'immunisation active et passive dirigées contre les toxines ont montré une protection contre les ICD. Cependant, ces stratégies n'agissent pas sur l'étape de colonisation de l'hôte par *C. difficile* et par conséquent participeraient peu à la réduction de la dissémination. En ciblant les protéines de surface de *C. difficile* il serait possible de réduire la colonisation et de prévenir ainsi la dissémination de la bactérie par des patients qui libèrent un grand nombre de spores dans l'environnement (Figure 17).

Une stratégie vaccinale repose sur le choix de la cible vaccinale et de la voie d'administration. Trois conditions sont indispensables pour un candidat vaccin, il doit être immunogène, avoir un rôle ciblé dans la physiopathologie et doit être conservé entre les souches pour induire une protection contre différentes souches circulantes du pathogène.

Contre *C. difficile*, afin d'induire une réponse immunitaire adaptative au plus près du site d'infection, et réduire ainsi l'interaction précoce de la bactérie avec l'hôte, la voie muqueuse a été privilégiée.

**L'objectif de ce projet de thèse était de contribuer au développement d'une stratégie vaccinale par voie muqueuse ciblant les protéines de surface de *C. difficile* afin d'avoir un impact sur la colonisation intestinale.**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au précurseur de la couche-S, SlpA comme candidat vaccin. Dans une première étude, nous avons évalué la séroconversion pour SlpA de patients atteints d'ICD en comparaison avec des patients non porteurs de la bactérie. Puis dans une deuxième étude nous avons réalisé des essais de vaccination avec la protéine recombinante SlpA administrée par voie intra-rectale dans des modèles souris et hamster.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la flagelline FliC. Nous avons évalué les propriétés adjuvantes de FliC dans le modèle souris par une administration par voie intra-rectale ou intra-péritonéale. Enfin, en collaboration avec E. Fattal et N. Tsapis de l'Institut Galien (Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612), pour cibler la muqueuse colique

par voie orale et induire une immunité muqueuse protectrice contre *C. difficile*, nous avons encapsulé la flagelline FliC dans des billes de pectine. Dans un modèle hamster, nous avons comparé l'efficacité de différentes voies d'administration de FliC (encapsulée ou non) dans un essai de vaccination contre *C. difficile*.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de nouveaux candidats vaccins. Dans une première étude, nous avons étudié le rôle de la protéine de l'exosporium CdeM dans la physiopathologie des ICD, en collaboration avec A. Henriques, Universidade Nova de Lisboa, Portugal et B. Dupuy, Institut Pasteur de Paris. Dans une deuxième étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la lipoprotéine CD0873 dans la colonisation intestinale en collaboration avec S. Michell, (University of Exeter, Royaume Uni). Enfin, dans une dernière étude, nous avons testé l'association d'antigènes vaccinaux dans un essai de vaccination par voie intra-rectale dans un modèle hamster. En effet, la colonisation et la virulence de *C. difficile* étant multifactorielles, l'augmentation des cibles vaccinales pourrait améliorer le niveau de protection contre les ICD.

# Résultats

## 1. Le candidat vaccin SlpA

SlpA est le précurseur des deux protéines constituant la couche-S de *C. difficile* : la LMW-SLP et la HMW-SLP. Ces deux protéines sont majoritaires à la surface de *C. difficile* et ont des propriétés immunogéniques. Les protéines SLPs seraient essentielles pour *C. difficile* et interviennent dans l'adhésion de la bactérie au tissu épithélial intestinal. De plus, par leur interaction avec TLR4, elles participent à la réponse inflammatoire induite lors des ICD.

Dans une étude précédente réalisée au laboratoire, Péchiné *et al.* ont observé, lors d'essais d'immunisation par voie rectale dans le modèle hamster par des extraits pariétaux de *C. difficile*, une augmentation du taux de survie après infection de 33%. En outre, par une approche protéomique et une comparaison des sérums du groupe immunisé par rapport au groupe témoin, trois antigènes ont été désignés comme jouant un rôle dans la colonisation intestinale par *C. difficile* et l'induction d'une réponse de type anticorps spécifiques associée à une protection contre l'ICD chez le hamster (Péchiné *et al.* 2013). Ces trois antigènes étaient, une protéine chaperone DnaK, la protéine de choc thermique GroEL et le précurseur de la couche-S SlpA. Dans cette étude, la protéine GroEL s'est montrée efficace contre la colonisation par *C. difficile* lors d'un essai d'immunisation par voie muqueuse (intra-nasale). Dans la continuité de ces travaux, nous avons ici évalué le potentiel du précurseur SlpA comme candidat vaccin.

Cette étude est à l'origine de deux articles. Le premier est une étude descriptive sur la séroconversion spécifique anti-SlpA de patients atteints d'ICD. Le deuxième évalue l'intérêt du précurseur SlpA comme antigène vaccinal ciblant la colonisation et la virulence de *C. difficile* dans deux essais d'immunisation intra-rectale dans un modèle souris et un modèle hamster.

## **1.1. Article 1: Evaluation of the Surface Layer Protein (SlpA) precursor of *Clostridium difficile* as a possible vaccine candidate for *Clostridium difficile* infection**

En cours de soumission.

### **Présentation de l'article.**

L'objectif de cette étude était de décrire la réponse systémique de type anticorps de l'hôte spécifique anti-SlpA au cours d'une ICD. Les taux d'anticorps totaux, d'IgG et d'IgM circulants anti-SlpA ont été évalués chez des patients atteints d'ICD simple ou récidivante à différents temps après le diagnostic de l'infection.

Entre Juillet 2013 et Septembre 2016, un total de 87 patients a participé à l'étude. Parmi ces patients, 65 ont présenté un seul épisode d'ICD, 19 ont présenté une ICD récidivante avec deux épisodes et 3 ont présenté une ICD récidivante avec plus de 2 épisodes. Les sérums ont été collectés à différents temps à partir du diagnostic initial. Ils ont été classés en 3 groupes représentant 3 périodes successives: le jour du diagnostic correspondant au début de l'infection, entre 5 et 25 jours après le diagnostic afin d'évaluer la réponse précoce, et après 25 jours après le diagnostic pour évaluer la réponse tardive. Des sérums provenant de patients non porteurs de *C. difficile* et sans historique d'ICD ont servi de contrôles négatifs.

Les sérums ont été analysés par ELISA. La protéine SlpA recombinante issue de la souche 630 (ribotype 012) de *C. difficile* a été utilisée comme antigène.

### **Principaux résultats.**

Les patients atteints d'un unique épisode d'ICD présentaient un taux d'anticorps totaux et d'IgG anti-SlpA significativement supérieur par rapport au groupe contrôle aux temps précoces et tardif de l'infection. En revanche, les patients atteints d'ICD récidivantes présentaient des taux d'anticorps totaux et d'IgG anti-SlpA similaires au groupe contrôle. La réponse IgM était hétérogène entre les patients et aucune différence significative entre les groupes n'a été observée.

## Discussion et conclusion.

Cette étude décrit pour la première fois la réponse humorale systémique dirigée contre SlpA dans une large cohorte de patients à différents temps, et montre l'établissement d'une réponse IgG anti-SlpA dès les temps précoces de l'infection chez les patients atteints d'un seul épisode d'ICD. En revanche, les patients atteints d'une ICD récidivante ne semblent pas développer de réponse anti-SlpA, quel que soit le type d'immunoglobuline.

Les analyses de séquences montrent que le précurseur SlpA est conservé entre des souches de mêmes ribotypes (Spigaglia *et al.* 2011; Lynch *et al.* 2017). Alors que le domaine correspondant à la HMW-SLP est hautement conservé avec près de 97% de similarité entre les souches de *C. difficile* (Calabi *et al.* 2001), le domaine correspondant à la LMW-SLP est variable et permet de distinguer plusieurs variants de SlpA (Karjalainen *et al.* 2002; Dingle *et al.* 2013). Par ailleurs, la protéine SlpA semble être immunologiquement différente entre des souches de ribotypes éloignés tels que la souche 630 (ribotype 012) et des souches de ribotype 027 (Shirvan and Aitken 2016). La protéine recombinante utilisée pour les tests ELISA a été produite à partir de la séquence peptidique de la souche 630 de *C. difficile*. Par conséquent, dans cette étude, nous avons essentiellement détecté les anticorps anti-SlpA reconnaissant ce variant. Afin de déterminer la séroconversion anti-SlpA de manière globale, il serait intéressant d'utiliser comme antigène la protéine SlpA des souches isolées de chaque patient ou plus simplement d'inclure des variants de SlpA issus de plusieurs ribotypes de souches de *C. difficile* les plus fréquemment isolées.

Malgré la variabilité de SlpA, son étroite implication dans la physiopathologie des ICD ainsi que ses propriétés immunogènes ouvrent la voie à une potentielle utilisation dans une stratégie vaccinale.

## **Title**

Evaluation of the Surface Layer Protein (SlpA) precursor of *Clostridium difficile* as a possible vaccine candidate for *Clostridium difficile* infection

## **Author names and affiliations**

Assaf Mizrahi <sup>1,2\*</sup>, Jean-François Bruxelles <sup>1\*</sup>, Séverine Péchiné <sup>1</sup>, Alban Le Monnier <sup>1,2</sup>

\* These authors contributed equally to this work

<sup>1</sup> EA 4043 "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup> Service de Microbiologie Clinique de dosage des anti-infectieux, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, 75014 Paris, France

## **Corresponding author**

Dr Assaf Mizrahi, PharmD

Email : [amizrahi@hpsj.fr](mailto:amizrahi@hpsj.fr)

Postal address : Service de Microbiologie Clinique de dosage des anti-infectieux, Groupe Hospitalier

Paris Saint Joseph, 185, rue Raymond Losserand, 75014 Paris, France

Tel : +33144127030

Fax : +33144123513

## **Abstract**

*Clostridium difficile* is responsible for various clinical manifestations ranging from mild diarrhea to life threatening fulminant pseudomembranous colitis. SIpA is the precursor of the S-layer of *C. difficile*. The main objective of this work was to describe the host immune response against SIpA during *C. difficile* infection (CDI) in order to evaluate the potential of SIpA as a candidate vaccine antigen. Sera of 87 included patients were collected at the day of CDI diagnosis as well as at an early and late period after infection. Patients with a single episode had a significantly higher anti-SIpA IgG antibody level than patients with recurrent CDI ( $p = 0.0197$ ). Specific anti-SIpA IgG seems to be protective against recurrence. These findings are promising and confirm the interest of SIpA as a vaccine antigen.



## 1 Introduction

2 *Clostridium difficile* is responsible for various clinical manifestations ranging from mild diarrhea  
3 to life threatening fulminant pseudomembranous colitis. The pathogenic process includes spore  
4 germination in the intestinal tract, colonization by vegetative cells and finally toxins production.  
5 Treatment of *C. difficile* infection (CDI) is mostly based on antibiotics targeting the vegetative forms but  
6 recurrences occur in 20 to 50% of patients [1].

7 Recently, several studies showed that colonization factors, in association with toxins (TcdA, TcdB), are  
8 essential in the infection process [2]. The main colonization factors of *C. difficile* are the flagella (the  
9 flagellin FliC, the cap protein FliD), the cell wall proteins such as Cwp66, Cwp84 and the most  
10 abundant, the S-layer proteins (SLPs) [3].

11 SlpA is the precursor of the S-layer of *C. difficile* and is composed by: a signal peptide, the  
12 high molecular weight SLP (HMW-SLP) and the low molecular weight SLP (LMW-SLP). After a post-  
13 translational cleavage by the protease Cwp84, the HMW-SLP and LMW-SLP reassemble at the  
14 bacterial surface to form the matured S-layer [4].

15 Various studies confirmed that SlpA could be a promising vaccine antigen [5,6] but few data are  
16 available about the human immune response directed against SlpA.

17 Therefore, the main objective of this work was to describe the host immune response against SlpA  
18 during CDI in order to evaluate the potential of SlpA as a candidate vaccine antigen.

19

## 20 Material and Methods

### 21 *Production and purification of the SlpA*

22 SlpA was produced as previously described [7]. Briefly, the *slpA* gene from the *Clostridium*  
23 *difficile* 630 strain was cloned in frame with histidine tags into a pMG25 plasmid, which was introduced  
24 by transformation into *E. coli* BL21. SlpA was obtained after purification by a single-step affinity  
25 chromatography (BD Talon cobalt affinity resin, BD Biosciences).

26

### 27 *Study protocol*

28 All adult patients with non-severe CDI hospitalized at the Saint-Joseph hospital, Paris, France,  
29 between July 2013 and September 2016 were eligible for study enrolment.

30 Sera were collected prospectively from patients the day of CDI diagnosis. When possible, further sera  
31 were collected to determine an early (between day 5 and 25) and late antibody response (after 25  
32 days). Patients with more than one episode of recurrence were followed on a longer time period and  
33 additional sera were collected. Patients with no available serum at the day of diagnosis were  
34 monitored over time and late sera were collected when possible. According to the ESCMID  
35 diagnostics guideline, the laboratory diagnosis of CDI was established by the immuno-detection of the  
36 glutamate dehydrogenase combined with free toxins in the stools (Alere). A real-time polymerase  
37 chain reaction (qPCR) was performed on stool samples (Xpert *C. difficile*, Cepheid) in case of  
38 discrepancy [8].

39 A serum was also collected from ten patients, constituting the control group, with a negative result for  
40 *C. difficile* detection and no previous history of CDI.

41

#### 42 *Measurement of antibody response by ELISA*

43 Anti-SlpA antibody level was measured by ELISA as previously described [7]. Briefly, sera  
44 were tested at the dilutions of 1:10 (IgM and total antibodies) and 1:100 (IgG). Immunoglobulin levels  
45 were expressed in O.D. <sub>405nm</sub> units.

46

#### 47 *Statistical analysis*

48 We compared anti-SlpA antibody level of CDI patients versus control group at various periods using a  
49 Mann-Whitney-Wilcoxon test. The alpha level was set at 0.05.

50

#### 51 Results

52 87 patients gave their consent to participate to the study. 65 patients (75%) presented a single  
53 episode (SE), 22 (25%) presented at least one episode of recurrence (R).

#### 54 - *Total anti-SlpA antibodies (Figure 1)*

55 At the day of diagnosis, there was no statistical difference in anti-SlpA total antibody levels  
56 between the groups.

57 During the early and late infection period, we noticed a significant elevation of total anti-SlpA  
58 antibody levels in SE patients compared to the control group ( $p = 0.0003$  and  $p = 0.0009$  respectively)  
59 and to patient with recurrent CDI ( $p = 0.0015$  and  $p = 0.0295$  respectively).

60 - *Specific anti-SlpA IgM (Figure 2)*

61 Anti-SlpA IgM response was heterogeneous among patients. There was no statistical difference in  
62 specific anti-SlpA IgM levels between the groups from the day of diagnosis to the late period.

63

64 - *Specific anti-SlpA IgG (Figure 2)*

65 At the day of diagnosis, a few patients had already a high level of anti-SlpA IgG. There was no  
66 significant difference in antibody levels between all groups.

67 Regarding the early response against the infection, patients with a SE had significantly higher anti-  
68 SlpA IgG antibody level compared to patients with recurrent CDI and control group patients ( $p =$   
69  $0.0197$  and  $p = 0.0062$  respectively).

70 Finally, for the late response, SE patients displayed also a significant higher IgG antibody level  
71 than the control group ( $p = 0.031$ ).

72

73 - *Case of patients with multiple recurrences (Figure 3)*

74 Three patients presented more than two episodes of recurrence and were thus followed for a longer  
75 period of time. We observed low levels of specific anti-SlpA IgM and IgG antibody levels with no  
76 increase during all the follow-up period.

77

## 78 Discussion

79 The human immune response to *C. difficile* toxins has been well studied and consequently,  
80 emerging immunological therapies such as vaccines targeting the toxins are under clinical evaluation  
81 [9]. Although these therapies showed promising preliminary results, they are only targeting the  
82 symptomatic phase and not the colonization process, thereby do not prevent the spread of spores and  
83 further cases of CDI.

84 Human adaptive immune response to colonization factors of *C. difficile* is poorly described. FliC, FliD,  
85 Cwp84, Cwp66 and native S-layer proteins (SLPs) were found to be immunogenic during the course of  
86 infection [10].

87 The SLPs are implicated in host-bacteria interactions, they contribute to *C. difficile in vitro*  
88 adherence to enterocytes [11] and Caco-cells [12]. They have also been implicated in the host innate

89 immune response by activating TLR4 [13]. In a lethal-hamster model of CDI, passive immunization  
90 using anti-SLP antibodies delayed significantly the progress of the infection [14].

91 In a previous study, we conducted a vaccination assay with a cell wall extract of a non-  
92 toxigenic *C. difficile* strain in a lethal-hamster model of CDI, which led to a significant longer survival in  
93 immunized hamsters. Using a comparative proteomic analysis between sera from immunized animals  
94 and the control group, three proteins have been identified as key factors leading to production of  
95 protective antibodies. One of these key factors was SlpA, the precursor of the SLPs [15]. Therefore,  
96 SlpA is an immunoreactive protein that could be responsible for the observed hamster protection. We  
97 then conducted another vaccination assay using SlpA as antigen combined with cholera toxin as  
98 adjuvant in mouse and hamster models of CDI [7]. The vaccination induced a local and systemic  
99 humoral immune response in both models and led to a decrease of *C. difficile* colonization in mice as  
100 well as a partial protection in the lethal-hamster model.

101 Thus, SlpA could be a possible vaccine candidate but the evaluation of the human immune response  
102 to SlpA in CDI patients was required.

103 In our study, we showed that patients can mount a specific immune response against SlpA during a  
104 CDI. Some patients had already a high level of specific IgG at the day of CDI diagnosis. Some others  
105 did not seem to have reacted to SlpA.

106 We can hypothesize that patients with high level of specific IgG at the day of diagnosis could have  
107 been previously colonized with a strain of *C. difficile* or because a delay in CDI diagnosis. A further  
108 study with a serum sample before the day of diagnosis, ideally before the onset of infection, to assess  
109 the base level of specific antibodies is needed.

110 We showed that patients with a single episode of CDI had a significant higher level of total antibodies  
111 and IgG against SlpA during the early response compared to patients with recurrence or control group.  
112 This rapid increase in specific IgG response could be the result of an anamnestic response. This  
113 anamnestic response has already been observed with anti-TcdA antibody levels and appears to  
114 prevent recurrence [16].

115 We did not find any difference of anti-SlpA IgM levels between CDI patients and a control group at  
116 any time after the infection. Drudy *et al.* found that patients with recurrences failed to mount an  
117 efficient IgM immune response to SLPs compared to patients with a single episode of CDI [17]. Our

118 study did not confirm these results but these authors used crude native S-layer proteins, unlike the  
119 SlpA used in this study, and with a different follow up.

120 Finally, patients who showed multiple recurrences did not mount a specific antibody response during  
121 the study period. These findings underline the potential relationship between recurrence and the  
122 incapacity to mount a specific immune response against *C. difficile* antigens including SlpA.

123

#### 124 Conclusion

125 SlpA appeared to be immunogenic in patients during CDI. Specific anti-SlpA IgG could be protective  
126 against recurrences. These results are promising and confirm the interest of SlpA as a vaccine  
127 antigen. A vaccine containing SlpA could be used for prevention or therapeutic purposes in order to  
128 cure the symptomatic patients as well as to reduce the bacterium colonization, preventing the  
129 dissemination and cross-contamination.

130

131

132

133

134

Conflicts of interest: none

135

136

Keywords: SlpA, *Clostridium difficile*, host immune response

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175 Figures legends

176

177 **Figure 1.**

178 **Serum levels of total antibodies against SIpA in patients who developed a single episode of**  
179 ***Clostridium difficile* infection compared to patients with recurrent episodes or control group**

180

181

182 **Figure 2. Serum levels of IgM and IgG antibodies against SIpA in patients who developed a**  
183 **single episode of *Clostridium difficile* infection compared to patients with recurrent episodes**  
184 **or control group**

185

186

187 **Figure 3. Serum levels of IgM and IgG antibodies against SIpA in 3 patients with more than one**  
188 **episode of *Clostridium difficile* infection**

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

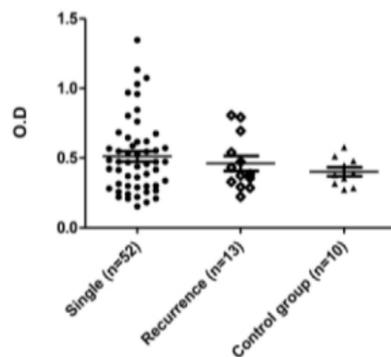
245

246

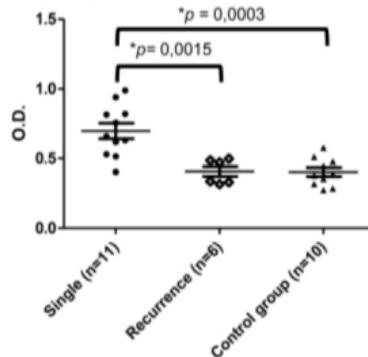
247 References

- 248
- 249 [1] Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious  
250 Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the  
251 treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur*  
252 *Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2014;20 Suppl 2:1–26. doi:10.1111/1469-0691.12418.
- 253 [2] Mizrahi A, Collignon A, Péchiné S. Passive and active immunization strategies against  
254 *Clostridium difficile* infections: state of the art. *Anaerobe* 2014;30:210–9.  
255 doi:10.1016/j.anaerobe.2014.07.006.
- 256 [3] Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*  
257 2016;37:13–24. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.009.
- 258 [4] Kirby JM, Ahern H, Roberts AK, Kumar V, Freeman Z, Acharya KR, et al. Cwp84, a surface-  
259 associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium*  
260 *difficile*. *J Biol Chem* 2009;284:34666–73. doi:10.1074/jbc.M109.051177.
- 261 [5] Kandalaf H, Hussack G, Aubry A, van Faassen H, Guan Y, Arbabi-Ghahroudi M, et al. Targeting  
262 surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against  
263 *Clostridium difficile*-associated disease. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:8549–62.  
264 doi:10.1007/s00253-015-6594-1.
- 265 [6] Kirk JA, Banerji O, Fagan RP. Characteristics of the *Clostridium difficile* cell envelope and its  
266 importance in therapeutics. *Microb Biotechnol* 2016;n/a-n/a. doi:10.1111/1751-7915.12372.
- 267 [7] Bruxelle J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S. Immunogenic properties of  
268 the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models.  
269 *Anaerobe* 2016;37:78–84. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.010.
- 270 [8] Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al. European Society  
271 of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for  
272 *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*  
273 2016;22 Suppl 4:S63-81. doi:10.1016/j.cmi.2016.03.010.
- 274 [9] Kocielek LK, Gerding DN. Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile*  
275 infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:150–60. doi:10.1038/nrgastro.2015.220.
- 276 [10] Péchiné S, Collignon A. Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 2016.  
277 doi:10.1016/j.anaerobe.2016.04.014.
- 278 [11] Calabi E, Calabi F, Phillips AD, Fairweather NF. Binding of *Clostridium difficile* surface layer  
279 proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* 2002;70:5770–8.
- 280 [12] Merrigan MM, Venugopal A, Roxas JL, Anwar F, Mallozzi MJ, Roxas BAP, et al. Surface-layer  
281 protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PloS One*  
282 2013;8:e78404. doi:10.1371/journal.pone.0078404.
- 283 [13] Ryan A, Lynch M, Smith SM, Amu S, Nel HJ, McCoy CE, et al. A role for TLR4 in *Clostridium*  
284 *difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002076.  
285 doi:10.1371/journal.ppat.1002076.
- 286 [14] O'Brien JB, McCabe MS, Athié-Morales V, McDonald GSA, Ní Eidhin DB, Kelleher DP. Passive  
287 immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer  
288 proteins. *FEMS Microbiol Lett* 2005;246:199–205. doi:10.1016/j.femsle.2005.04.005.
- 289 [15] Péchiné S, Hennequin C, Boursier C, Hoys S, Collignon A. Immunization using GroEL  
290 decreases *Clostridium difficile* intestinal colonization. *PloS One* 2013;8:e81112.  
291 doi:10.1371/journal.pone.0081112.
- 292 [16] Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and  
293 protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet Lond Engl* 2001;357:189–93.  
294 doi:10.1016/S0140-6736(00)03592-3.
- 295 [17] Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, et al. Human antibody  
296 response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*  
297 2004;41:237–42. doi:10.1016/j.femsim.2004.03.007.
- 298

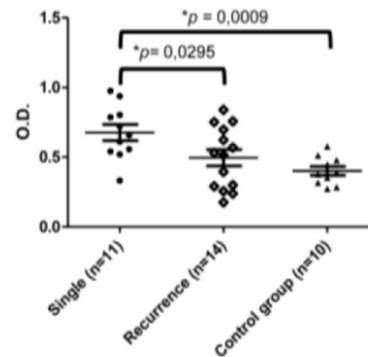
Onset of infection - Total anti-SlpA antibodies



Early response - Total anti-SlpA antibodies

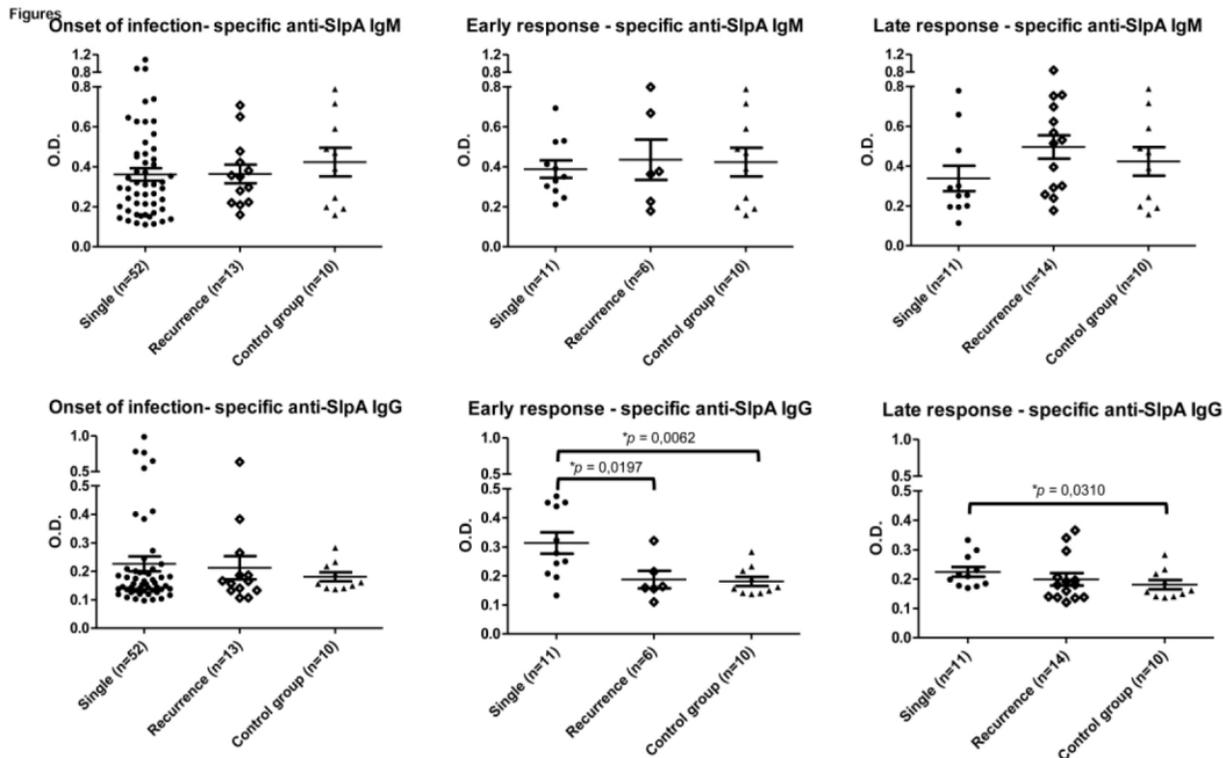


Late response - Total anti-SlpA antibodies

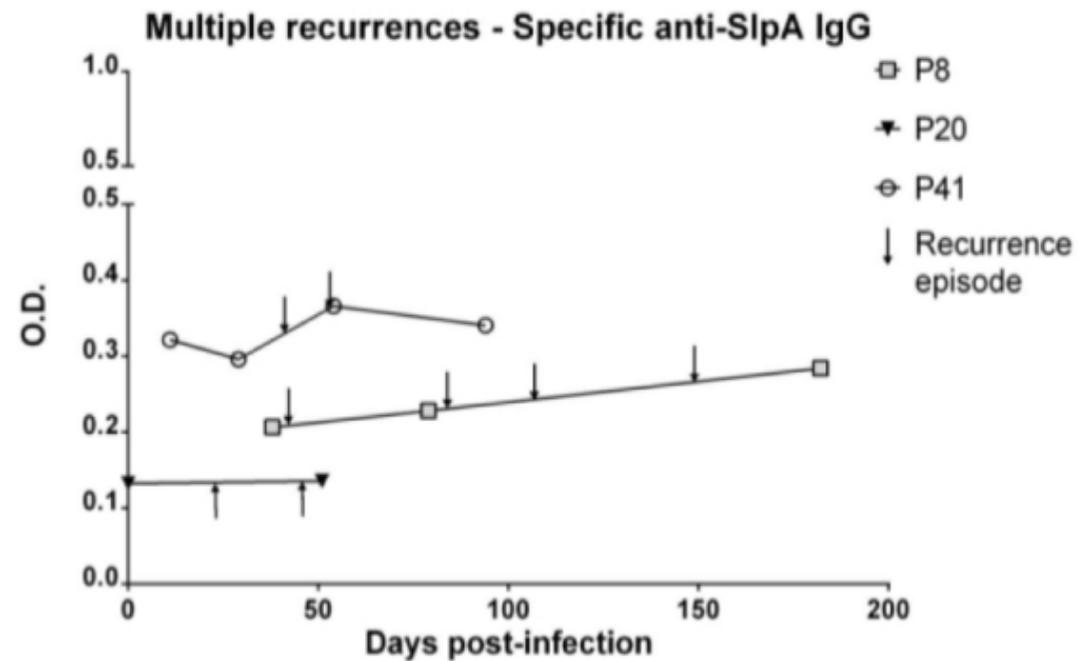
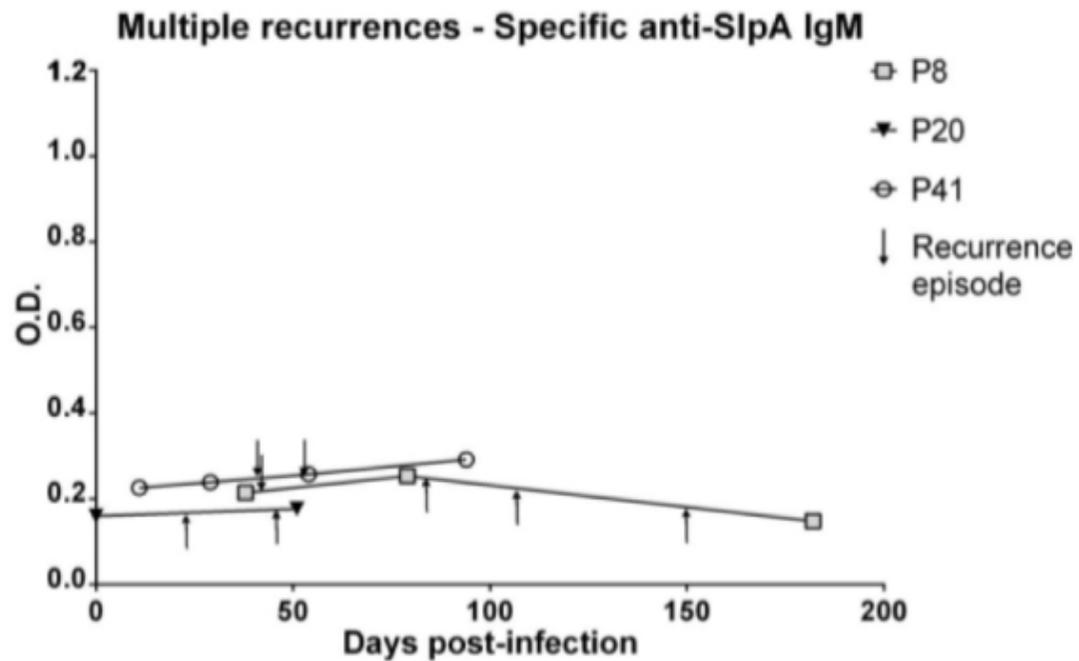


**Figure 1.** Serum levels of total antibodies against SlpA in patients who developed a single episode of *Clostridium difficile* infection compared to patients with recurrent episodes or control group.



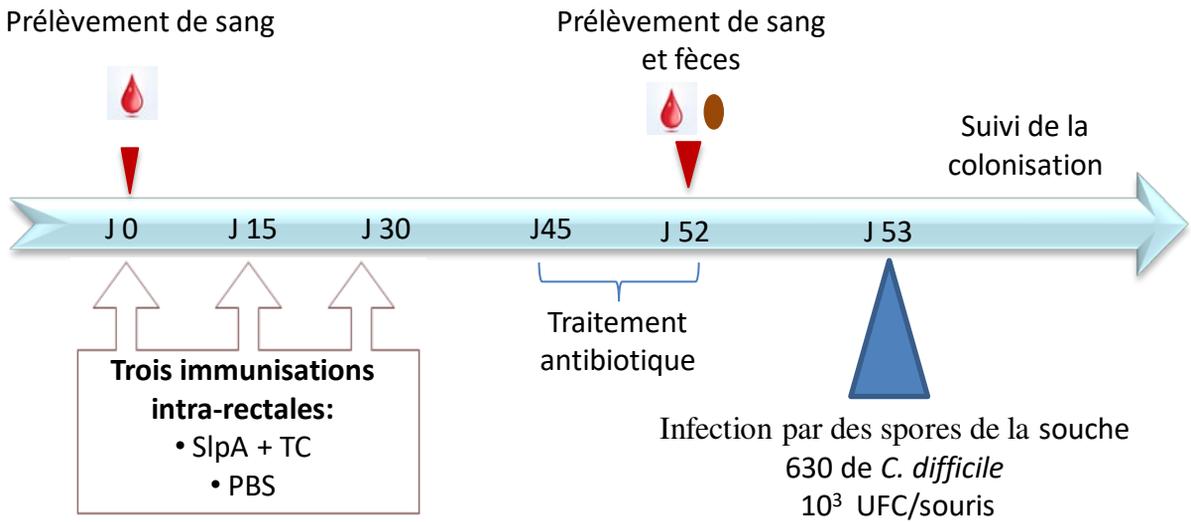


**Figure 2.** Serum levels of IgM and IgG antibodies against SlpA in patients who developed a single episode of *Clostridium difficile* infection compared to patients with recurrent episodes or control group.

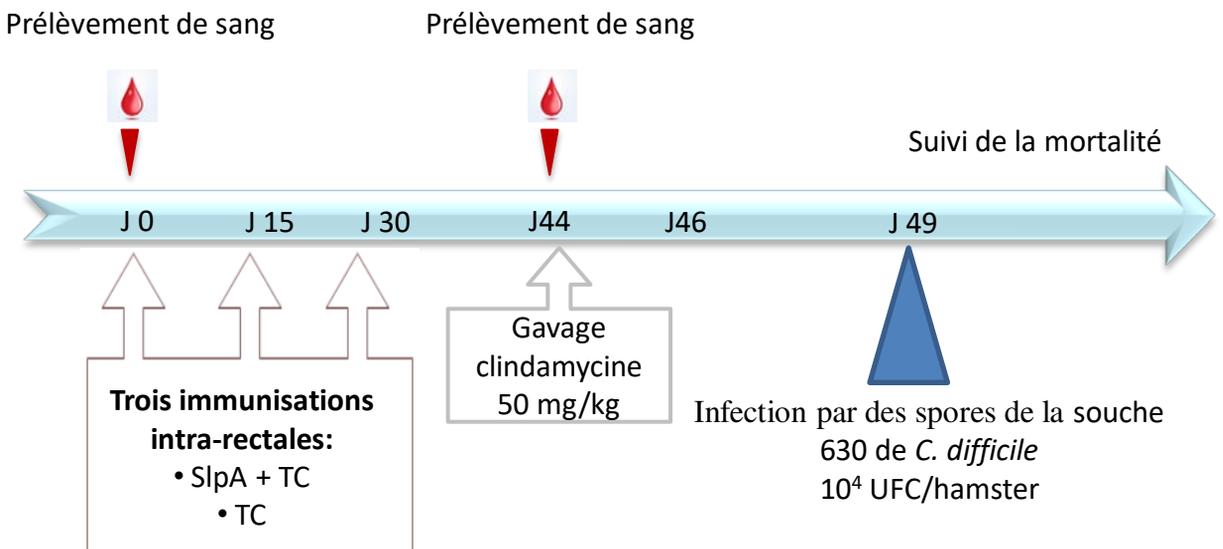


**Figure 3.** Serum levels of IgM and IgG antibodies against SlpA in three patients with more than one episode of *Clostridium difficile* infection.

### a. Essai souris



### b. Essai hamster



**Figure 18.** Protocole de vaccination avec SlpA et TC par voie intra-rectale contre *C. difficile*  
a. Modèle souris b. Modèle hamster

## **1.2. Article 2: Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models**

Bruxelle J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S (2016). *Anaerobe* 37:78–84. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.010

### **Présentation de l'article.**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'utilisation de SlpA comme antigène vaccinal dans une stratégie d'immunisation par voie muqueuse ciblant la colonisation par *C. difficile*. Dans un premier temps, nous avons évalué les propriétés immunogènes de SlpA au cours de l'infection chez des patients atteints d'ICD. Dans un deuxième temps, nous avons évalué les effets protecteurs de la vaccination corrélés à l'induction d'une réponse immunitaire locale et systémique de type anticorps spécifique anti-SlpA dans deux essais d'immunisation par voie intra-rectale dans un modèle souris et un modèle hamster.

Les sérums de 22 patients atteints d'ICD ont été analysés par ELISA pour évaluer le taux d'anticorps totaux sériques anti-SlpA comparativement à 5 sérums de patients sains non porteurs de *C. difficile*.

Par la suite, 12 souris femelles ont été réparties en deux groupes : le premier groupe a été immunisé par voie intra-rectale avec SlpA comme antigène et la toxine cholérique (TC) comme adjuvant, le deuxième groupe a reçu uniquement un placebo. Après immunisations, les souris ont reçu un traitement antibiotique altérant le microbiote intestinal avant d'être infectées par *C. difficile*. Le taux de colonisation par *C. difficile* post-challenge a été suivi par numération de *C. difficile* (formes végétatives et spores) dans les fèces. La réponse de type anticorps IgG sériques et IgA fécales anti-SlpA a été évaluée avant et après immunisation par méthode immuno-enzymatique. (Figure 18 a). Cet essai a été fait deux fois

Dans un deuxième essai d'immunisation, deux groupes de huit hamsters femelles, ont été soit immunisés par voie intra-rectale avec SlpA comme antigène et la toxine cholérique (TC) comme adjuvant soit ont reçu uniquement un placebo. Après traitement antibiotique, les hamsters ont été infectés par une dose létale de *C. difficile*. Le taux de survie a été suivi après challenge et la réponse IgG sérique anti-SlpA avant et après immunisation a été évaluée par méthode immuno-enzymatique (Figure 18 b).

## **Principaux résultats.**

Les patients atteints d'ICD présentaient un taux d'anticorps anti-SlpA sérique significativement plus important que les patients non porteurs de *C. difficile*.

Les souris immunisées avec le précurseur SlpA et la TC comme adjuvant présentaient un taux fécal de *C. difficile* plus faible que les souris non immunisées et cette différence était significative 10 jours après le challenge. L'immunisation intra-rectale par SlpA et la TC a induit la production d'IgG sériques et d'IgAs anti-SlpA chez la souris.

Pour les hamsters immunisés, un retard de mortalité était observé associé à la production d'IgG sériques spécifiques. La moitié des hamsters dans le groupe témoin étaient morts le deuxième jour après l'infection, alors que la moitié des hamsters vaccinés ont survécu jusqu'au cinquième jour. Cependant, cette différence n'était pas statistiquement significative.

## **Discussion et conclusion.**

Les SLPs sont les protéines majoritaires et immunodominantes de la surface de *C. difficile* (Wright *et al.* 2008). Les deux composants de la couche-S, la HMW-SLP et la LMW-SLP participent activement à la pathogénèse des ICD tant par leur capacité d'adhésion au tissu épithélial que par leur implication dans la réponse inflammatoire (Calabi *et al.* 2002; Ryan *et al.* 2011). Ces activités peuvent être inhibées par des anticorps spécifiques anti-SLPs. La protéine SlpA étant le précurseur des deux protéines HMW-SLP et LMW-SLP, il peut présenter les mêmes épitopes que les SLPs matures et représente ainsi un intéressant candidat vaccin.

Au cours de notre étude nous avons montré les propriétés immunogènes du précurseur SlpA au cours du processus physiopathologique chez des patients atteints d'ICD. Ces résultats ont été confirmés et affinés lors de la précédente étude avec une plus grande cohorte de patients (article 1). De plus, nous avons aussi montré qu'une vaccination dans un modèle souris et hamster avec SlpA comme antigène et la TC comme adjuvant par voie intra-rectale induit une réponse de type anticorps locale et systémique spécifique de SlpA. Cette réponse induite est potentiellement responsable de la faible diminution du taux de colonisation par *C. difficile* chez les souris immunisées et de la protection partielle observée dans le modèle hamster. Par ailleurs, nous avons confirmé ici l'intérêt de la voie muqueuse pour induire une réponse

immunitaire protectrice locale. L'ensemble de ces résultats suggère que le précurseur SlpA peut être utilisé dans une stratégie vaccinale par voie muqueuse ciblant la colonisation et la virulence de *C. difficile*. Cependant, la protection partielle obtenue tant pour la colonisation digestive dans le modèle souris que pour la survie dans le modèle hamster est en accord avec une origine multifactorielle du processus de colonisation et de pathogénicité. Ces résultats suggèrent la nécessité de combiner plusieurs antigènes vaccinaux pour avoir une protection totale.



## Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models



J.-F. Bruxelles<sup>1</sup>, A. Mizrahi<sup>1</sup>, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné\*

EA 4043 "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 July 2015

Received in revised form

1 October 2015

Accepted 21 October 2015

Available online 24 October 2015

### ABSTRACT

*Clostridium difficile* is an opportunistic pathogen causing gut inflammation generally associated with an intestinal dysbiosis due to antibiotics. Several virulence factors have been identified as playing a key role in gut colonization. The surface-layer proteins, comprised of two proteins, the high molecular weight SlpA (HMW-SLP) and the low molecular weight SlpA (LMW-SLP), are the most abundant proteins on the *C. difficile* surface. These two proteins are derived from the Cwp84-mediated cleavage of a single precursor protein SlpA. In this study, we assessed the immunogenic properties of a recombinant SlpA precursor derived from a toxigenic *C. difficile* strain (630) and its protective effect as a vaccine antigen co-administered with the cholera toxin as an adjuvant in both hamster and mouse models.

First, we confirmed the immunogenicity of SlpA in humans. Sera from patients with *C. difficile* infection were analyzed by ELISA. Patients with CDI have a greater number of SlpA antibodies than healthy patients, confirming the immunogenicity of this protein during the pathogenic process. Then, rectal vaccination assays were performed in both conventional hamsters and mice. The animals' sera were sampled before and after vaccination, and were analyzed by ELISA. In addition, in the mouse model, feces were sampled after vaccination and IgA directed against SlpA were detected by ELISA. In both models, the intestinal colonization was evaluated by fecal bacterial count after challenge. Intra-rectal vaccination with SlpA and cholera toxin as an adjuvant induced a local and systemic humoral immune response in mice and hamsters potentially responsible for the weak decrease of *C. difficile* colonization in mice and the partial protection observed in a lethal-hamster model.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Clostridium difficile* is an obligate anaerobic spore forming Gram positive rod-shaped bacterium. The intestinal colonization by *C. difficile* in humans can be asymptomatic or responsible for a wide spectrum of gastrointestinal manifestations ranging from diarrhea to pseudomembranous colitis [1]. During the past decade, the prevalence of *C. difficile* infections (CDI) has dramatically increased, making *C. difficile* the leading cause of infectious nosocomial diarrhea associated to antibiotics.

The establishment of *C. difficile* requires an intestinal microbiota dysbiosis as well as a contamination by spores of *C. difficile*. After spore germination in the digestive tract, the vegetative forms multiply and colonize the colon thanks to host-colonization factors

interaction. The two major toxins TcdA et TcdB are responsible for the clinical signs [2]. Although the mechanism of action of these toxins has been elucidated, the colonization process is multifactorial and has yet to be clarified. However, it has been shown that *C. difficile* expresses to its surface cell wall structures, including adhesins, playing a key role in colonization [3–6]. Among these surface structures, the surface layer proteins (SLPs) are the most abundant [7].

Every strain of *C. difficile* has a S-layer composed of two proteins organized in two layers. The high molecular weight SLP (HMW-SLP) forms the inner layer and the low molecular weight SLP (LMW-SLP) forms the outer layer. These two proteins are derived from a common precursor SlpA encoded by a unique gene *slpA*. The SlpA precursor is secreted and then cleaved at the surface by the cysteine protease Cwp84 [8,9]. The HMW-SLP protein (42–48 kDa) corresponds to the C-terminal part of the precursor. It contains cell wall anchoring domains that are responsible for association with the polysaccharide II and are relatively well conserved among strains

\* Corresponding author.

E-mail address: [severine.pechine@u-psud.fr](mailto:severine.pechine@u-psud.fr) (S. Péchiné).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

[10–13]. Calabi et al. showed the role of the HMW-SLP in adhesion to gastrointestinal tissue [7]. The LMW-SLP protein (32–38 kDa) corresponds to the N-terminal part of the precursor, constitutes the outermost layer and is highly variable among strains [10–12]. This heterogeneity may affect recognition by antibodies, which presumably reflects pressure from the host immune response. As the major surface antigen of *C. difficile*, it is not surprising that SLPs play a role in the pathogenesis of CDI and in the host immune response. Indeed, SLPs have been shown to bind enterocytes which infers that the S-layer might function as an adhesin [7]. Furthermore it has been shown in animal models and in humans that SLPs induce the release of pro-inflammatory cytokines from monocytes and induce a humoral immune response [14,15].

Current guidelines of treatment for CDI consist in the administration of specific antibiotics (metronidazole or vancomycin or fidaxomicin), depending on the severity of the infection [16]. However, although *C. difficile* strains are susceptible to these antibiotics, these antibiotics may contribute to the dysbalance of the intestinal microbiota and relapses are frequent. Alternative therapeutic approaches are therefore required. Among them, fecal microbiota transplantation and immunotherapy are very promising. To prevent relapses and trigger long-term protection against CDI, immunotherapy targeting the toxins and the colonization factors appears to be a rational strategy [17]. Passive immunization using anti-SLP antibodies significantly delays the progress of CDI in the hamster model [18]. SLPs have also been tested as vaccine components in hamsters but antibody production was variable and generally modest or poor, leading to the absence of total protection of the animals [19]. In addition, in a human microbiota-associated mouse model, we showed that *C. difficile* cell wall extracts used as antigens for intra-rectal vaccination were able to delay *C. difficile* colonization [20]. Similarly, we vaccinated hamsters with a cell wall extract of a non-toxicogenic *C. difficile* strain and a partial protection of hamsters against a lethal dose of *C. difficile* was observed. Using a comparative proteomic analysis between sera from protected immunized animals and sera from the control group, three proteins have been identified as key factors leading to a production of protective antibodies. One of these key factors was the SlpA precursor [21], which means that SlpA is one of the immunodominant surface proteins of *C. difficile* in the hamster model.

The aim of this study was to assess the immunogenic properties of a recombinant SlpA protein derived from a toxigenic strain of *C. difficile* and to evaluate its protective effect as a vaccine antigen combined with cholera toxin adjuvant in both mouse and hamster models. We first confirmed the immunogenicity of SlpA in humans, and then studied the immunogenicity and protective properties of SlpA as a vaccine antigen in animal models.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cloning of the recombinant SlpA

For the cloning of the *C. difficile* 630 *slpA* gene into an expression vector, two oligonucleotide primers, 5'-GGATCCTAGTGATGGT-GATGGTGATGGTGATGCATATCTAATAAATCTTTCATTTTG-3' and 5'-GAATTCGAGGAATAAATATGGCAACTACTGGAACACAAGGTTA-TACTG-3', incorporating the *Bam*HI and *Eco*RI restriction site, respectively, were designed to amplify by PCR the full-length coding region of the *slpA* gene of 630 *C. difficile* strain using the *Phusion* enzyme (Thermo scientific; 2 U per  $\mu$ l reaction volume). The resulting 2.4 kb DNA product blunt ended was cloned into the pBlunt plasmid and transformed into *Escherichia coli* strain TG1. After extraction of the plasmid and purification of the insert digested by *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzyme, *slpA* gene was cloned in frame with histidine tags into a pMG25 plasmid. The

nucleotide sequence of the insert was confirmed by sequencing analysis. The plasmid was transformed into *E. coli* BL21.

### 2.2. Expression and purification of the fusion protein

Protein expression was performed in LB broth containing ampicillin (100  $\mu$ g/ml) and 1 mM of IPTG for induction. Bacteria were collected by centrifugation and resuspended in sodium phosphate 50 mM, NaCl 300 mM, Urea 8 M, pH = 8. The bacteria were lysed by sonication and insoluble material was removed by centrifugation. The fusion protein was purified from the supernatant by a single-step affinity chromatography using BD Talon cobalt affinity resin (BD Biosciences) as described in the protocols supplied by the manufacturer. The eluted fraction containing the recombinant protein was dialyzed overnight against phosphate buffered saline (PBS) and then frozen at  $-20^{\circ}$ C for storage.

### 2.3. SDS-PAGE and immunoblotting

SlpA's fractions were separated by electrophoresis in a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto a PVDF membrane for immunoblotting. The membrane was incubated overnight at room temperature in blocking buffer, followed by 2 h of incubation with rabbit's anti-HMW-SLP antibodies. Bound antibodies were detected using goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (1/2000 dilution; Sigma) and nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate as enzyme substrate (Invitrogen).

### 2.4. Animal models

Two animal models have been used: 1) the hamster model, which allows to observe animal protection against infection but is not the most suitable to follow protection against *C. difficile* colonization [22]; 2) the mouse model, which allows *C. difficile* intestinal colonization monitoring [23]. *In vivo* experiments were performed at the animal central care facility of the faculty of Pharmacy, University Paris-Sud.

#### 2.4.1. Hamster model of protection

Adult *Mesocricetus auratus* female hamsters (weight, 80–100 g, Charles River's laboratories, France), were housed individually in micro-isolator cages. All food, water, bedding and cages were autoclaved before being used.

#### 2.4.2. Mouse model of colonization

Six weeks old female C57BL/6 J mice (Charles River's laboratories France) were caged in groups of six.

Animals were anaesthetized during collections of blood and during intra-rectal immunizations by intraperitoneal injection of Ketamine 1000 (100 mg/kg), Rompun 2% (0.25 mL/kg). After orogastric infection of animals by *C. difficile* 630 spores, they may develop diarrhea characterized by a wet tail and traces of liquid stool in the litter, mild, moderate or severe weight loss, and decrease in activity. Animals were euthanized when they had a weight loss greater than 20% of their initial weight and/or a significant decrease in activity.

The animals that did not present any clinical signs were euthanized at the end of the study.

### 2.5. Vaccination regimen

We selected the intra-rectal route to induce a local immunization as previously described [20].



### 2.5.1. Hamster model

Vaccination trial was performed using recombinant SlpA as antigen and cholera toxin as an adjuvant. The total animal number was 16, equally distributed between the control group and the SlpA-vaccinated group. Hamsters were intra-rectally vaccinated with either 10 µg of cholera toxin (CT) (List biological laboratories, INC) as an adjuvant for the control group or a combination of 10 µg of CT and 100 µg of recombinant SlpA for the vaccinated group. Hamsters were immunized on days 0, 15 and 30. Before and fifteen days after the last immunization, hamsters were anaesthetized for a blood sample. On day 44, hamsters were orally administered a single dose of 50 mg/kg of clindamycin to disrupt the barrier microbiota. Five days after, hamsters were challenged by oral administration of  $5.10^4$  spores of *C. difficile* 630.

### 2.5.2. Mouse model

The control group of six mice received intra-rectally 80 µl of phosphate-buffered saline (PBS). The vaccinated group of six mice received 50 µg of purified recombinant SlpA and 5 µg of cholera toxin. Mice were vaccinated with three doses on days 0, 15, 30. To disrupt the barrier microbiota, one week before challenge, mice were orally administered a cocktail of antibiotics composed of kanamycin (40 mg/kg), gentamicin (3.5 mg/kg), colistin (4.2 mg/kg), metronidazole (21.5 mg/kg), vancomycin (4.5 mg/kg) for seven consecutive days, with a dose on the third day of treatment of clindamycin (10 mg/kg). One day after antibiotic treatment stop (day 52), mice were challenged by oral administration of  $7.8 \cdot 10^2$  spores of *C. difficile* 630. Vaccination trials were performed in duplicate.

Spores of the *C. difficile* strain 630 were prepared as previously described [24].

### 2.6. *C. difficile* detection in mouse fecal samples

To assess the colonization rate, fecal pellets were cultured before antibiotic administration and daily for ten days after *C. difficile* challenge. Fecal samples were processed as previously described [20]. By using this method, the threshold of *C. difficile* detection in animal feces was 10 CFU/mg.

### 2.7. Serum sampling for immune analysis

#### 2.7.1. Animal sera

Blood samples were withdrawn before the first immunization and after the last immunization, just before *C. difficile* challenge. Each animal was sampled under anesthesia directly by heart puncture or from the retro-orbital sinus.

#### 2.7.2. Mouse feces

Feces were sampled after vaccination. Fifty mg of feces were suspended in 1 ml of PBS, BSA 1%, Tween 20 0.1% and protease inhibitor cocktail (Sigma). After centrifugation at  $12,000 \times g$  for 2 min supernatants were used for IgA detection by ELISA [25].

#### 2.7.3. Human sera

Samples were obtained from 22 patients with CDI aged between 6 and 95 years from various hospitals (collection of the laboratory). The sera were obtained one to three weeks after the diagnosis of CDI. Control subject sera were composed of 5 sera from healthy women attending a maternity ward with *C. difficile* negative stool culture (culture and toxins negative).

### 2.8. Measurement of antibody response in animals by ELISA

Indirect ELISA was used to detect antibodies in the sera as

described before [26]. Wells of a 96-well microtitre plate (Maxisorp, Nunc) were coated with 5 µg of recombinant purified SlpA.

Mouse samples were tested at a dilution of 1:10. After washing, positive reactions were detected by successive incubations with a goat anti-mouse immunoglobulins G and A (IgG, IgA) conjugated to biotin (1:20,000 dilution; Sigma) for 30 min at 37 °C and with a streptavidin–horseradish peroxidase conjugate (1:1000 dilution; Amersham) for 30 min at 37 °C. Hamster samples were tested at dilution 1:20. The secondary antibody was rabbit anti-hamster IgG conjugated to biotin (1:20,000 dilution; Biosystem).

Human sera were tested at dilution 1:5, with goat anti-human polyvalent immunoglobulin conjugated to biotin (1/8000 dilution; Sigma) as the secondary antibody.

All samples were tested in duplicate and treated simultaneously to avoid inter-assay variation. Assays with antigen in the absence of sera served as negative controls. Immunoglobulin levels were expressed in  $A_{405nm}$  units.

### 2.9. Statistical analysis

The non-parametric Mann–Whitney U test was used to compare data between two different groups. The non-parametric Wilcoxon signed-rank test was used to compare matched samples within one group. Kaplan-meier test was used to compare the survival in the hamster model. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### 2.10. Ethics statement

The protocols involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international laws and policies. All efforts were made to minimize animal suffering. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments n°26 of the University of Paris-Sud (n°2012-118 for hamster vaccination assays and n° 2012-119 for mouse vaccination assays).

## 3. Results

### 3.1. Purification of recombinant SlpA

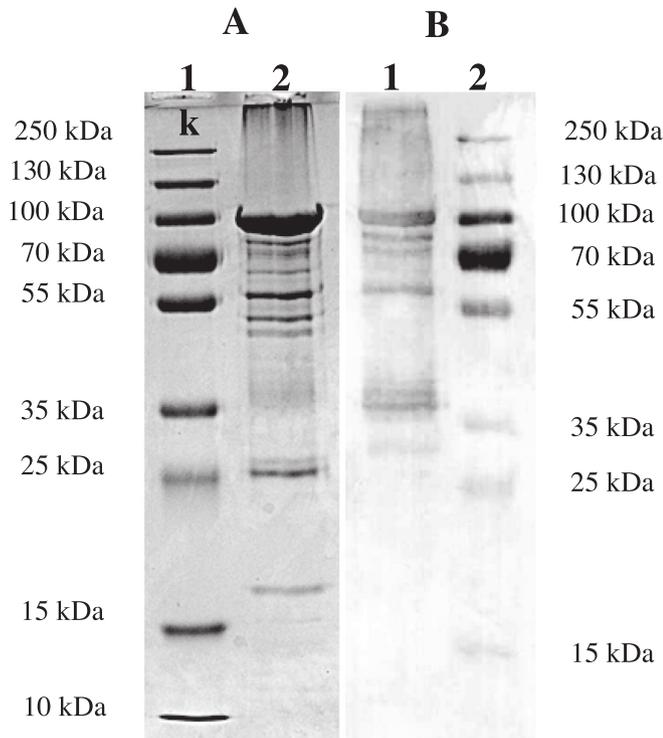
SlpA has been purified and used for the vaccination assays as well as for the serological tests. On SDS-PAGE the recombinant SlpA migrates around 90 kDa. The degradation products are likely the results of proteolytic digestion during the purification process (Fig. 1).

### 3.2. Immunogenicity of SlpA in humans

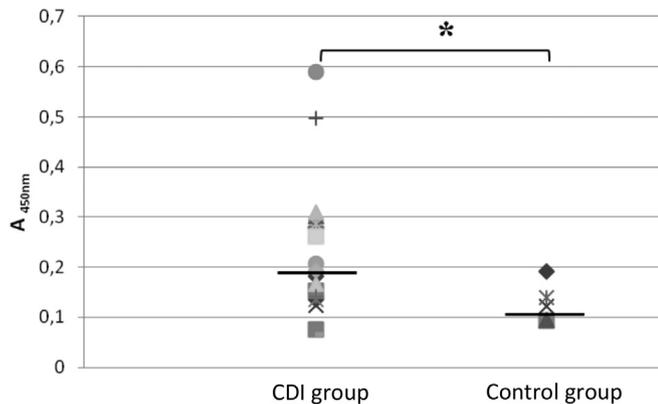
Since we wanted to use SlpA as a vaccine to protect against CDI, we have assessed its immunogenicity in humans. As shown in Fig. 2, despite an important inter-individual variability, patients with CDI displayed significantly more antibodies (median value 0.20 and mean value 0.23) against SlpA than healthy patients (median value 0.12 and mean value 0.13  $p < 0.025$ ).

### 3.3. Decrease of *C. difficile* gut colonization in vaccinated mice

We tested the ability of recombinant SlpA to protect mice from a challenge with *C. difficile*. Mice were vaccinated by a rectal route with SlpA and cholera toxin and the control group received PBS. Then, mice were challenged with the virulent *C. difficile* strain 630. As shown in Fig. 3, from day 2 after challenge to day 10, the *C. difficile* fecal bacterial count was always lower in the SlpA vaccinated group than in the control group. At day 10, the



**Fig. 1.** (A) Recombinant SlpA on SDS-page. Column 1: molecular weight, column 2: SlpA fraction after purification. (B) Immunoblot analysis of recombinant SlpA probed with rabbit antisera directed to the HMW-SLP. Column 1: SlpA fraction after purification, column 2: molecular weight.



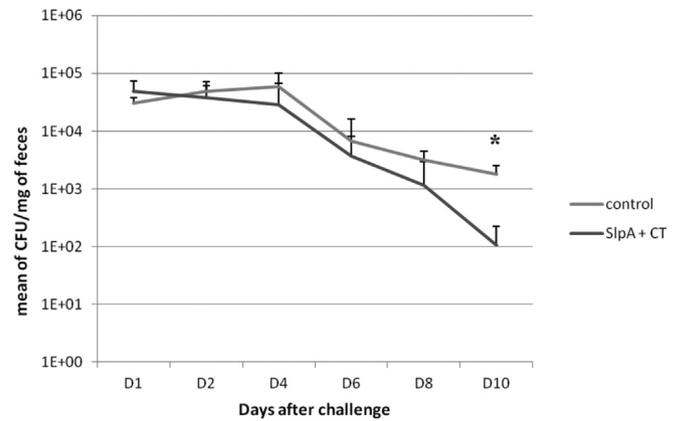
**Fig. 2.** SlpA specific antibodies in patients' sera with CDI and control group composed of healthy patients. \*:  $p < 0.025$ .

difference between vaccinated mice and non-vaccinated mice was statistically significant ( $p < 0.002$ ).

### 3.4. Antibody response to SlpA after vaccination in the mouse model

Since we vaccinated mice by a mucosal route in order to induce a specific mucosal and systemic humoral immune response, we analyzed by ELISA SlpA-specific IgG and IgA levels elicited in sera and feces respectively.

As expected, mice produced specific antibodies against SlpA after intra-rectal vaccination. As shown in Fig. 4A, the IgG levels in vaccinated mouse sera were significantly higher after vaccination



**Fig. 3.** Evaluation of *C. difficile* colonization level in the mouse model from day 1 to day 10 in the vaccinated and in the control group. \*:  $p < 0.002$ .

than in control mouse sera ( $p < 0.05$ ). In addition, the same trend was observed for IgA levels (Fig. 4B), after vaccination at day 52, mice that were vaccinated with SlpA associated with cholera toxin (TC) had a statistically higher level of SlpA specific IgA in feces than non-vaccinated mice ( $p < 0.002$ ).

### 3.5. Protection against *C. difficile* infection in vaccinated hamsters

Hamsters are extremely sensitive to CDI and this model is often used as a protection model. Two groups of 8 animals were vaccinated by an intra-rectal route. A control group was vaccinated with cholera toxin, while the vaccinated group was vaccinated with the recombinant SlpA protein associated with cholera toxin. After challenge, *C. difficile* colonization was monitored by enumeration in fecal samples and the animal survival was followed.

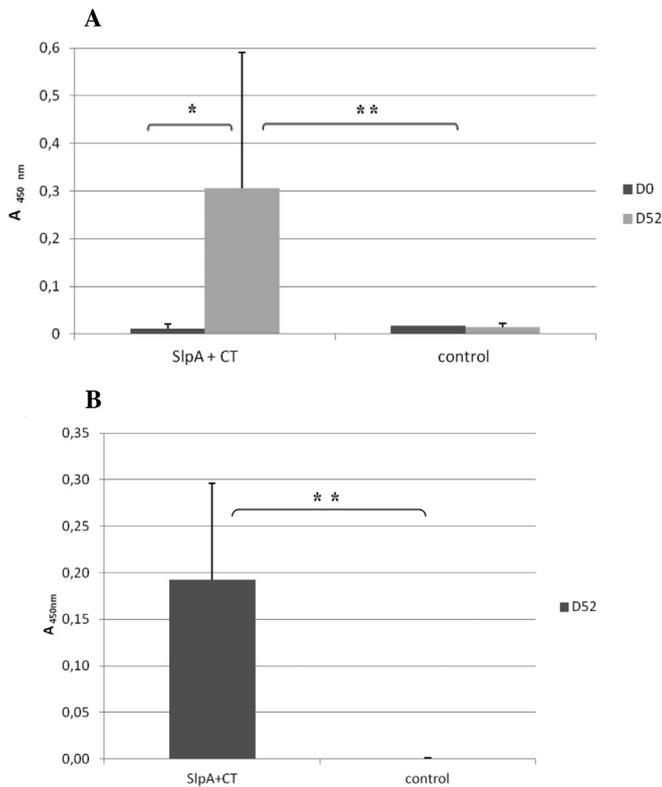
In the vaccinated group the mean survival time was 111 h (+/- 30 h) whereas in the control group it was 96 h (+/- 42 h). Despite a close mean survival time, a slight difference was observed between the two groups. As shown in Fig. 5, half of the vaccinated animals survived until the fifth day whereas in the control group half of the hamsters were dead on the second day after challenge. However, this difference was not statistically significant with the Kaplan-Meier analysis. *C. difficile* fecal bacterial count after challenge in surviving hamsters showed that all animals were still colonized by *C. difficile* during the whole assay (data not shown).

### 3.6. Antibody response to SlpA after vaccination in the hamster model

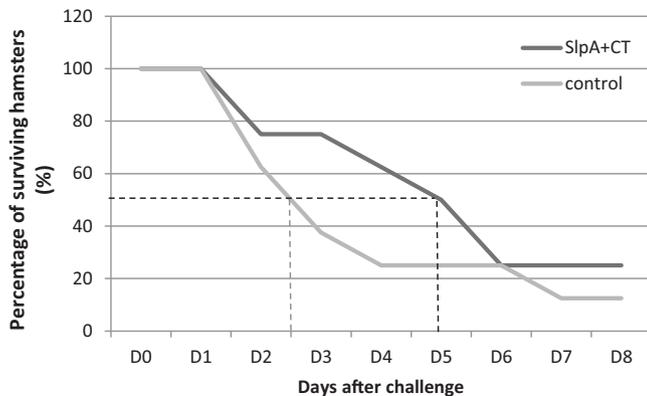
Intra-rectal vaccination of hamsters with SlpA induced a significant production of specific IgG. As shown in Fig. 6, 15 days after the last immunization, the levels of SlpA specific IgG were significantly higher compared to day 0 before the first immunization, confirming the immunogenicity of this protein ( $p < 0.01$ ). In addition, the specific IgG level was 4 times higher in the vaccinated group than in the control group ( $p < 0.0002$ ). So, SlpA-vaccinated hamsters produced a significantly higher IgG level than hamsters of the control group.

## 4. Discussion

As the outermost bacterial layer, the S-layer represents the majority of the surface antigens. Furthermore, in *C. difficile*, SLPs were shown to be immunodominant antigens in humans [27]. The



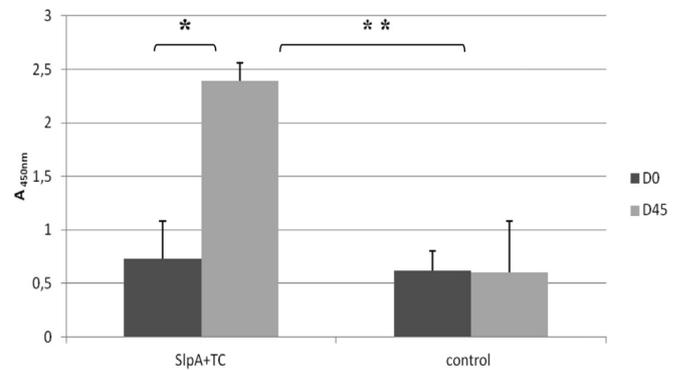
**Fig. 4.** Immune response mounted against SlpA in vaccinated mice. (A) IgG levels against SlpA in mouse sera from the vaccinated and control groups, before vaccination (D0) and after vaccination D52); (B) IgA levels against SlpA in mouse feces from the vaccinated and control groups, after vaccination (D52). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.002$ .



**Fig. 5.** Percentage of surviving hamsters after challenge by *C. difficile* 630 strain in the vaccinated and control groups. 50% survival at day 5 in the vaccinated group and at day 2 in the control group.

precursor SlpA may share epitopes with the mature SLPs and patients with CDI may produce antibodies recognizing SlpA. In this study, we showed that sera from a group of CDI patients contained significantly more antibodies specific to SlpA than sera from a group of healthy patients. This confirms that this protein is immunogenic in humans and is likely involved in the infectious process of *C. difficile*. Therefore SlpA may constitute a key target for vaccine development.

Indeed, S-layers have important roles in bacterial growth, survival and diverse functions in many species including the



**Fig. 6.** IgG levels against SlpA in hamster sera of the vaccinated and control groups, before vaccination (D0) and after vaccination (D52). \*:  $p < 0.01$ ; \*\*:  $p < 0.0002$ .

maintenance and protection of cell integrity, enzyme display, surface protein anchoring, adhesin properties as well as interaction with the host and its immune system [28]. In *C. difficile*, SLPs have a critical role in pathogenesis, since they were shown to play a role in adherence to enterocytes and extracellular matrix components [7]. Recently, anti-HMW SLP and anti-LMW SLP polyclonal antisera were shown to reduce *C. difficile* strain 630 adherence to Caco-2 cells [29]. Moreover, SLPs were shown to have a role in activating innate and adaptive immunity by inducing pro-inflammatory cytokines [30]. Interestingly Ryan et al. showed that both the HMW and LMW SLPs of *C. difficile* were required for the activation of dendritic cells through TLR4 and subsequently induced T helper cell responses that are known to be involved in the clearance of bacterial pathogens through humoral response [15]. Therefore, both the HMW and the LMW SLPs seem necessary to induce an adaptive immune response. It could be interesting to test if the SlpA precursor is able to induce a neutralizing antibody response against the two components of the S-layer.

In previous mucosal vaccination trials with the hamster model using *C. difficile* cell wall extracts as vaccine antigen, we observed an increase in the survival rate of up to 25% after infection. Furthermore, with a proteomic approach comparing sera from the vaccinated group with sera from the control group, specific antibodies directed against SlpA were detected in the vaccinated group [21]. Therefore, in continuing this work, we tested the recombinant SlpA protein as an antigen in a mucosal vaccine with the cholera toxin as an adjuvant in a mouse model in order to assess the putative protective effect of SlpA vaccination against *C. difficile* colonization. Differences between the vaccinated and control groups were significant ten days after *C. difficile* challenge ( $p < 0.002$ ). The diminution of *C. difficile* colonization observed in the control group is certainly due to a natural clearance of the bacteria associated with the re-establishment of the commensal microbiota in the gut niche. We correlated these results with the immune response by measuring the production of specific immunoglobulin G against SlpA in mouse sera. Since we chose the intra-rectal route to induce a local immunity, we also assessed the induction of a mucosal response with production of specific IgA. Our results confirm the interest of the rectal route of vaccination for inducing a systemic as well as a local immune response.

Complementary to the colonization assay in mice, we assessed the putative protective effect of SlpA vaccination on *C. difficile* virulence in the hamster model of infection. Although the vaccination induced production of specific antibodies against SlpA, the protection against CDI remained partial and was not statistically significant between the vaccinated and the control groups. Our results are similar to the previous study of Ni Eidhin et al., in which

an intraperitoneal vaccination with an equimolar mixture of HMW and LMW SLPs of *C. difficile* in a hamster model did not significantly improve survival after challenge by *C. difficile*. Nevertheless, these hamsters have also synthesized IgG antibodies against the administered SLP mixture [19].

A stronger induction of the mucosal immunity may improve protection. Vaccines generally require the inclusion of adjuvants that engage the innate immune system to stimulate the antigen presentation and cytokine production necessary for successful immunization. For this reason, the cholera toxin has been used as an adjuvant, and it is known to have strong mucosal immunogenic properties and is commonly used for its adjuvant potential for mucosal vaccines in animal vaccination assays [31]. Actually, Ni Eidhin et al. in mucosal vaccination assay with native SLPs have tested the capacity of a range of adjuvants to induce a mucosal immunity in mice and hamsters [19]. The best and most consistent antibody responses were obtained using cholera toxin (CT) as the sole adjuvant.

SlpA, present at the surface, is secreted and then is cleaved extracellularly by Cwp84 in two subunits forming the S-layer. We can assume that by inducing a local immune response specific to the SlpA precursor, specific antibodies may cross-react between the SlpA precursor and the mature SLPs. Consequently, the maturation of SlpA could be inhibited leading to an incomplete S-layer. Therefore, these antibodies may restrict SLPs' role in pathogenesis and *C. difficile* colonization. Indeed, in a recent study using SLP-specific single-domain antibodies, it was shown that *C. difficile* opsonization by SLP antibodies inhibited motility *in vitro*, suggesting that antibodies binding to *C. difficile* SLPs may provide some form of steric hindrance probably because of the high abundance of SLPs on bacterial surface [32]. Despite a production of specific antibodies by immunization, the protection observed was partial and not sufficient to envisage SlpA as an unique antigen in a *C. difficile* vaccine. Our approach to vaccine development is through prevention of intestinal colonization by inducing a local protective immunity to colonization factors and surface exposed antigens. These are likely to stimulate local immunity and lead to production of neutralizing antibodies targeting the first line of bacterium–host interactions. The colonization process of *C. difficile* is multifactorial and involves several adhesins like SLPs but also the cell wall protein Cwp66 [3], the FbpA (Fibronectin Binding Protein) [4], GroEL (Heat Shock Protein) [33], and the flagellar proteins FlhD and FlhC [34]. Thus, to enhance the protection against *C. difficile* colonization, the SlpA vaccine candidate could be combined with one or several of these other surface-associated proteins for which interesting results have already been obtained [20,35].

Although the rectal route is interesting, an orally administered vaccine would be vastly superior because of the increased patient compliance, patient comfort and low cost. Unfortunately, delivery of vaccine antigens by the oral route is plagued with challenges such as gastrointestinal destruction of labile molecules, poor immunogenicity of orally delivered soluble antigens and inefficient uptake of the antigens. For this reason, it could be interesting to encapsulate SlpA in pectine beads, as already done for the protease Cwp84 [24].

To conclude, in this study we have shown that patients with CDI have higher SlpA antibodies than healthy patients, confirming the immunogenicity of this protein during the pathogenic process. Intra-rectal vaccinations with SlpA and cholera toxin as an adjuvant induced a local and systemic humoral immune response in mice and hamsters potentially responsible for the slight decrease of *C. difficile* colonization in mice and the partial protection observed in a lethal-hamster model. To obtain total protection against colonization and infection a combination of vaccine antigens appears to be a key solution.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr Thomas Candela for assistance with cloning of the recombinant SlpA and the Central Animal Care facility of the IFR IPSIT for their efficient handling and preparation of the animals.

## References

- [1] T.M. Monaghan, New perspectives in *Clostridium difficile* disease pathogenesis, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 29 (1) (Mar. 2015) 1–11.
- [2] D.E. Voth, J.D. Ballard, *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 247–263.
- [3] A.J. Waligora, Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties, *Infect. Immun.* 69 (2001) 2144–2153.
- [4] C. Hennequin, C. Janoir, M.C. Barc, A. Collignon, T. Karjalainen, Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*, *Microbiology* 149 (2003) 2779–2787.
- [5] C. Hennequin, F. Porcheray, A. Waligora-Dupriet, A. Collignon, M. Barc, P. Bourlioux, T. Karjalainen, GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence, *Microbiol. Read. Engl.* 147 (Pt 1) (Jan. 2001) 87–96.
- [6] A. Tasteyre, M.C. Barc, A. Collignon, H. Boureau, T. Karjalainen, Role of FlhC and FlhD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization, *Infect. Immun.* 69 (12) (Dec. 2001) 7937–7940.
- [7] E. Calabi, F. Calabi, A.D. Phillips, N.F. Fairweather, Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues, *Infect. Immun.* 70 (10) (Oct. 2002) 5770–5778.
- [8] J.M. Kirby, H. Ahern, A.K. Roberts, V. Kumar, Z. Freeman, K.R. Acharya, C.C. Shone, Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*, *J. Biol. Chem.* 284 (50) (Dec. 2009) 34666–34673.
- [9] T.H. Tam Dang, R.P. Fagan, N.F. Fairweather, E.W. Tate, Novel inhibitors of surface layer processing in *Clostridium difficile*, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2) (Jan. 2012) 614–621.
- [10] M. Cerquetti, A. Molinari, A. Sebastianelli, M. Diociaiuti, R. Petruzzelli, C. Capo, P. Mastrantonio, Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates, *Microb. Pathog.* 28 (6) (Jun. 2000) 363–372.
- [11] D.N. Eidhin, A.W. Ryan, R.M. Doyle, J.B. Walsh, D. Kelleher, Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, slpA, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*, *J. Med. Microbiol.* 55 (Pt 1) (Jan. 2006) 69–83.
- [12] E. Calabi, N. Fairweather, Patterns of sequence conservation in the S-layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*, *J. Bacteriol.* 184 (14) (Jul. 2002) 3886–3897.
- [13] S.E. Willing, T. Candela, H.A. Shaw, Z. Seager, S. Mesnage, R.P. Fagan, N.F. Fairweather, *Clostridium difficile* surface proteins are anchored to the cell wall using CWB2 motifs that recognise the anionic polymer PSII, *Mol. Microbiol.* 96 (3) (May 2015) 596–608.
- [14] C.M. Ausiello, M. Cerquetti, G. Fedele, F. Spensieri, R. Palazzo, M. Nasso, S. Frezza, P. Mastrantonio, Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells, *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 8 (11) (Sep. 2006) 2640–2646.
- [15] A. Ryan, M. Lynch, S.M. Smith, S. Amu, H.J. Nel, C.E. McCoy, J.K. Dowling, E. Draper, V. O'Reilly, C. McCarthy, J. O'Brien, D. Ni Eidhin, M.J. O'Connell, B. Keogh, C.O. Morton, T.R. Rogers, P.G. Fallon, L.A. O'Neill, D. Kelleher, C.E. Loscher, A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins, *PLoS Pathog.* 7 (6) (Jun. 2011) e1002076.
- [16] S.B. Debast, M.P. Bauer, E.J. Kuijper, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (Suppl. 2) (Mar. 2014) 1–26.
- [17] A. Mizrahi, A. Collignon, S. Péchiné, Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: state of the art, *Anaerobe* 30 (Dec. 2014) 210–219.
- [18] J.B. O'Brien, M.S. McCabe, V. Athié-Morales, G.S.A. McDonald, D.B. Ni Eidhin, D.P. Kelleher, Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins, *FEMS Microbiol. Lett.* 246 (2) (May 2005) 199–205.
- [19] D.B. Ni Eidhin, J.B. O'Brien, M.S. McCabe, V. Athié-Morales, D.P. Kelleher, Active immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using surface-layer protein, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52 (2) (Mar. 2008) 207–218.
- [20] S. Péchiné, C. Janoir, H. Boureau, A. Gleizes, N. Tsapis, S. Hoys, E. Fattal, A. Collignon, Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*, *Vaccine* 25 (20) (May 2007) 3946–3954.
- [21] S. Pechine, C. Hennequin, C. Boursier, S. Hoys, A. Collignon, Immunization using GroEL decreases *Clostridium difficile* intestinal colonization, *PLoS One* 8 (11) (Nov. 2013).
- [22] E.L. Best, J. Freeman, M.H. Wilcox, Models for the study of *Clostridium difficile*

- infection, *Gut Microbes* 3 (2) (Apr. 2012) 145–167.
- [23] T.D. Lawley, S. Clare, A.W. Walker, D. Goulding, R.A. Stabler, N. Croucher, P. Mastroeni, P. Scott, C. Raisen, L. Mottram, N.F. Fairweather, B.W. Wren, J. Parkhill, G. Dougan, Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts, *Infect. Immun.* 77 (9) (Sep. 2009) 3661–3669.
- [24] C. Sandolo, S. Péchiné, A. Le Monnier, S. Hoys, C. Janoir, T. Coviello, F. Alhaique, A. Collignon, E. Fattal, N. Tsapis, Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* 79 (3) (Nov. 2011) 566–573.
- [25] H.M.S. Grewal, T. Hemming Karlsen, H. Vetvik, C. Åhrén, H.K. Gjessing, H. Sommerfelt, B. Haneberg, Measurement of specific IgA in faecal extracts and intestinal lavage fluid for monitoring of mucosal immune responses, *J. Immunol. Methods* 239 (1–2) (May 2000) 53–62.
- [26] S. Péchiné, A. Gleizes, C. Janoir, R. Gorges-Kergot, M.-C. Barc, M. Delmée, A. Collignon, Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*, *J. Med. Microbiol.* 54 (Pt 2) (Feb. 2005) 193–196.
- [27] A. Wright, D. Drudy, L. Kyne, K. Brown, N.F. Fairweather, Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera, *J. Med. Microbiol.* 57 (Pt 6) (Jun. 2008) 750–756.
- [28] R.P. Fagan, N.F. Fairweather, Biogenesis and functions of bacterial S-layers, *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (3) (Mar. 2014) 211–222.
- [29] M.M. Merrigan, A. Venugopal, J.L. Roxas, F. Anwar, M.J. Mallozzi, B.A.P. Roxas, D.N. Gerding, V.K. Viswanathan, G. Vedantam, Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*, *PLoS One* 8 (11) (2013) e78404.
- [30] M. Bianco, G. Fedele, A. Quattrini, P. Spigaglia, F. Barbanti, P. Mastrantonio, C.M. Ausiello, Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains, *J. Med. Microbiol.* 60 (Pt 8) (Aug. 2011) 1162–1167.
- [31] K.J. Baldauf, J.M. Royal, K.T. Hamorsky, N. Matoba, Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications, *Toxins* 7 (3) (Mar. 2015) 974–996.
- [32] H. Kandalaf, G. Hussack, A. Aubry, H. van Faassen, Y. Guan, M. Arbabi-Ghahroudi, R. MacKenzie, S.M. Logan, J. Tanha, Targeting surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against *Clostridium difficile*-associated disease, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (May 2015) 1–14.
- [33] C. Hennequin, F. Porcheray, A. Waligora-Dupriet, A. Collignon, M. Barc, P. Bourlioux, T. Karjalainen, GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence, *Microbiol. Read. Engl.* 147 (Pt 1) (Jan. 2001) 87–96.
- [34] A. Tasteyre, M.C. Barc, A. Collignon, H. Boureau, T. Karjalainen, Role of FlhC and FlhD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization, *Infect. Immun.* 69 (12) (Dec. 2001) 7937–7940.
- [35] S. Péchiné, C. Denève, A. Le Monnier, S. Hoys, C. Janoir, A. Collignon, Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen: Immunization of hamsters against *Clostridium difficile*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63 (1) (Oct. 2011) 73–81.

## 2. Le candidat vaccin FliC

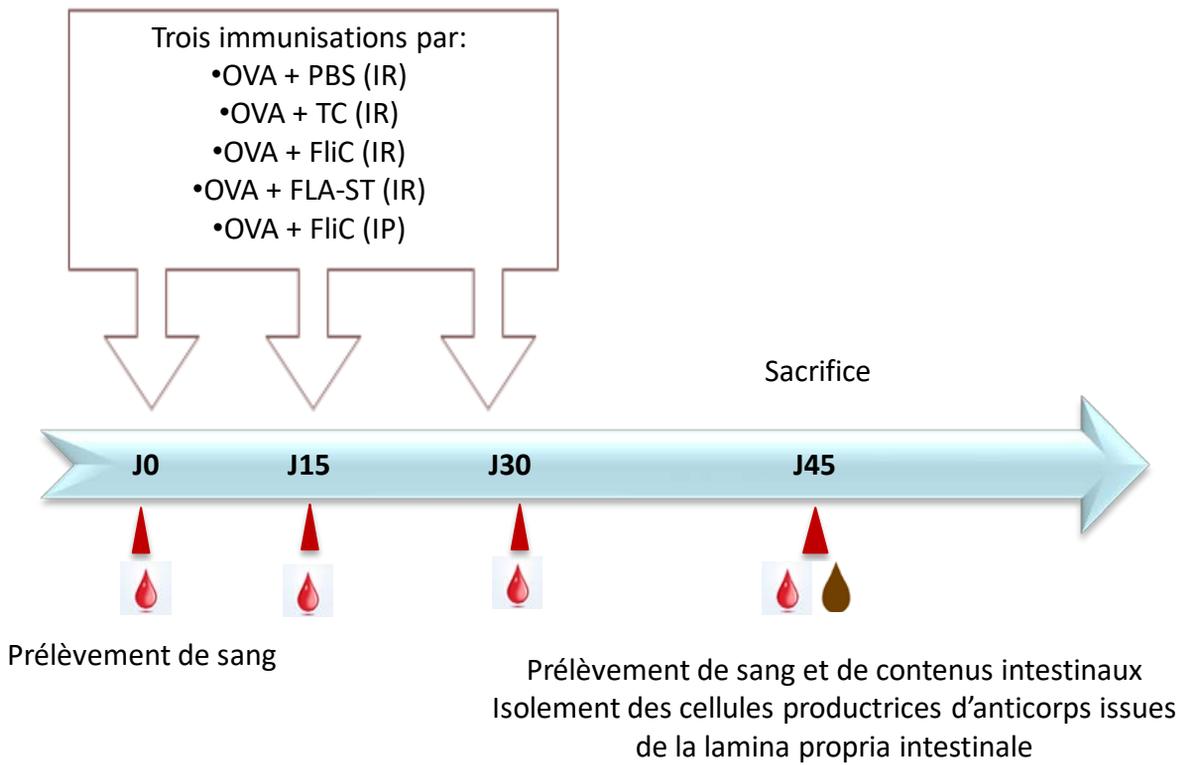
La flagelline FliC est un autre facteur de pathogénicité impliqué à la fois dans le processus de colonisation de *C. difficile* et dans la réponse inflammatoire de l'hôte. FliC est le composant structural majeur du corps flagellaire, ayant ainsi un rôle dans la motilité de la bactérie, dans la formation de biofilm et l'adhésion au tissu épithélial (Ramos *et al.* 2004). De plus, FliC participe à la régulation de l'expression de gènes pléiotropes de *C. difficile* notamment les gènes du Paloc. De manière générale les flagellines bactériennes sont connues pour être fortement immunogènes. Ces protéines sont considérées comme des PAMPs capables d'interagir avec les récepteurs TLR5 de l'immunité innée au niveau des muqueuses. Elles présentent un domaine antigénique extrêmement variable entre les espèces. En ce qui concerne *C. difficile*, l'interaction FliC /TLR5 a été montrée *in vitro* avec différents modèles de cellules épithéliales (Batah *et al.* 2016) et *in vivo* dans un modèle souris (Batah *et al.* 2017). Certaines études ont décrit les propriétés adjuvantes de la flagelline de *Salmonella*, et ont montré leur capacité à induire à la fois une réponse immunitaire systémique et muqueuse après administration par voie intra-nasale ou par voie parentérale. Par ailleurs, l'immunogénicité de FliC de *C. difficile* a été démontrée chez l'homme et dans des essais de vaccination chez l'animal. L'ensemble de ces résultats atteste du potentiel d'utilisation de la flagelline FliC comme adjuvant ou comme antigène vaccinal dans une stratégie vaccinale par voie muqueuse contre *C. difficile*.

L'étude de l'utilisation de FliC dans une stratégie vaccinale par voie muqueuse ciblant *C. difficile* est à l'origine de deux articles.

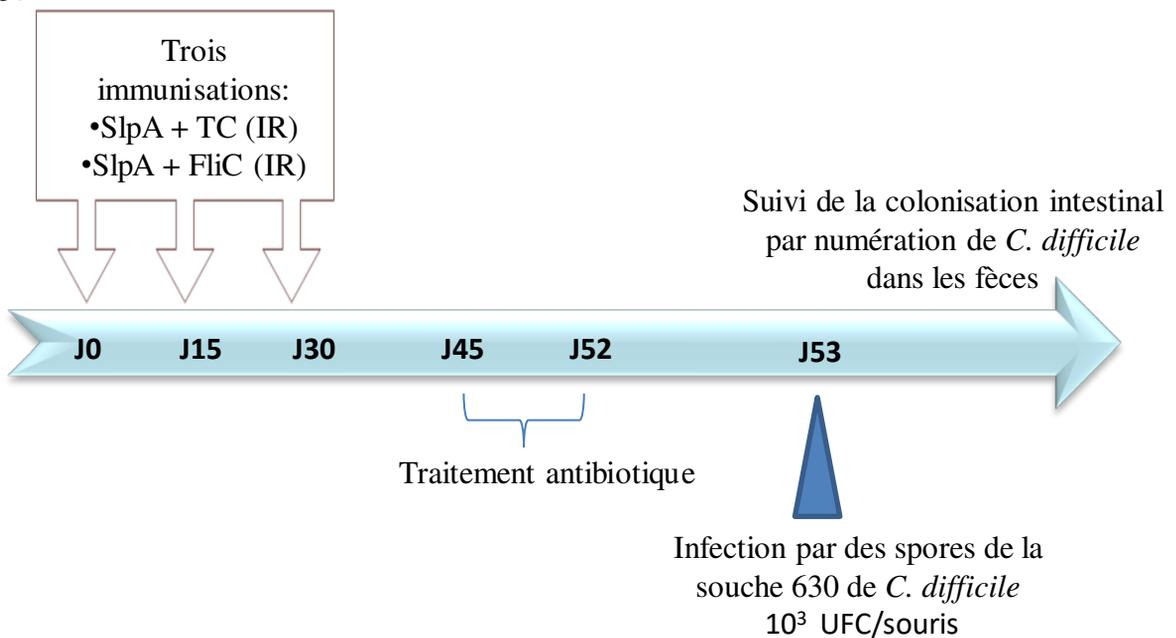
Dans le premier, la capacité adjuvante de FliC a été évaluée par voie intra-rectale et par voie intra-péritonéale dans un modèle murin avec l'ovalbumine (OVA) comme antigène. De plus, nous avons évalué son efficacité comme adjuvant muqueux associée avec le précurseur SlpA comme antigène dans un essai de vaccination chez la souris par voie intra-rectale ciblant la colonisation par *C. difficile*.

Le deuxième article présente l'utilisation de FliC comme antigène vaccinal encapsulé dans des billes de pectine dans une stratégie d'immunisation par voie orale chez le hamster.

a.



b.



**Figure 19.** Protocoles d'étude de la capacité adjuvante de FliC chez la souris. **a.** Comparaison entre la toxine cholérique (TC), la flagelline de *C. difficile* (FliC), la flagelline de *Salmonella* Typhymurium (FLA-ST) comme adjuvant avec l'ovalbumine comme antigène (OVA) **b.** Comparaison entre la toxine cholérique (TC), la flagelline de *C. difficile* (FliC) comme adjuvant avec SlpA comme antigène dans un essai de vaccination contre les infection à *C. difficile*.

IR: voie intra-rectale

IP: voie intra-péritonéale

## **2.1. Article 3: *Clostridium difficile* flagellin FliC: evaluation as adjuvant and use in a mucosal vaccine against *Clostridium difficile***

Article soumis à PlosOne, en révision.

### **Présentation de l'article.**

Les propriétés immunologiques de FliC témoignent d'une utilisation possible en tant qu'adjuvant muqueux. Certaines études ont décrit les propriétés adjuvantes de la flagelline de *Salmonella* Typhimurium, et ont montré sa capacité à induire à la fois une réponse immunitaire systémique et muqueuse par voie intra-nasale ou par voie parentérale (Mizel and Bates 2010; Fougeron *et al.* 2015). L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité adjuvante de FliC. Dans cette optique, la flagelline FliC a d'abord été étudiée avec l'ovalbumine comme antigène modèle, par voie muqueuse, intra-rectale (IR) et par voie parentérale, intra-péritonéale (IP). Puis la flagelline FliC a été utilisée comme adjuvant avec le précurseur SlpA comme antigène afin d'évaluer son efficacité dans une stratégie de vaccination par voie intra-rectale ciblant la colonisation par *C. difficile* chez la souris.

La capacité adjuvante de FliC a été évaluée en utilisant l'ovalbumine (OVA) comme antigène dans un modèle souris. Cette capacité adjuvante de FliC a été évaluée en comparant différentes voies d'immunisations : la voie intra-rectale et la voie intra-péritonéale. Par voie intra-rectale, la capacité adjuvante de FliC a été comparée à celle de la flagelline de *Salmonella* serovar Typhimurium (FLA-ST) et à celle de la toxine cholérique (TC). Dans deux essais indépendants, des souris ont été immunisées à trois reprises par des doses identiques d'antigène et d'adjuvant ou de placebo. Avant la première et après chaque immunisation, des échantillons de sang ont été collectés pour analyser la réponse de type anticorps (IgG sérique) anti-OVA. Après la dernière immunisation, les souris ont été sacrifiées et les contenus intestinaux ont été collectés pour analyser la réponse locale (IgA et IgG) anti-OVA. De plus, les cellules de la lamina-propria de la muqueuse intestinale ont été isolées pour détecter par ELISPOT les cellules productrices d'IgA et d'IgG anti-OVA. (Figure 19 a).

Puis, l'utilisation de la flagelline FliC comme adjuvant par voie intra-rectale a été comparée à la TC dans un essai d'immunisation contre *C. difficile* en utilisant le précurseur SlpA comme



antigène. Dans deux essais indépendants, des souris ont été immunisées à trois reprises par des doses identiques d'antigène et d'adjuvant ou de placebo. Après immunisations, les souris ont reçu un traitement antibiotique pour altérer le microbiote intestinal, puis ont été infectées par *C. difficile*. Le taux de colonisation intestinale a été suivi par numération bactérienne dans les fèces (Figure 19 b).

## **Principaux résultats.**

Dans un premier temps, nous avons montré que l'immunisation par voie intra-rectale et par voie intra-péritonéale avec la flagelline FliC en association avec l'OVA était capable d'induire une réponse immunitaire humorale OVA-spécifique au niveau de la muqueuse intestinale et au niveau systémique. Cependant, la réponse IgA et IgG spécifique anti-OVA était plus forte après immunisation par voie intra-péritonéale que par voie intra-rectale. Par voie intra-rectale, la TC a induit préférentiellement une réponse IgG systémique et locale alors que FliC a induit une réponse IgG systémique et une réponse IgA locale. La réponse immunitaire induite anti-OVA montrait que la flagelline FliC de *C. difficile* semblait avoir une capacité adjuvante supérieure par rapport à la flagelline de *Salmonella* FLA-ST.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que dans une stratégie d'immunisation par voie muqueuse intra-rectale ciblant le précurseur SlpA, FliC comme adjuvant était aussi efficace que la TC. Comparativement au groupe contrôle, nous avons observé une diminution du taux de colonisation par *C. difficile*, significative à 10 jours après l'administration d'une souche toxigène de *C. difficile*, aussi bien pour les souris immunisées avec FliC comme adjuvant qu'avec la TC.

## **Discussion et conclusion.**

Dans cette étude nous avons décrit pour la première fois les propriétés adjuvantes de la flagelline FliC de *C. difficile* après vaccination par voie intra-rectale et par voie intra-péritonéale et nous avons montré son efficacité dans une stratégie de vaccination par voie muqueuse contre les ICD. Par ailleurs, nous avons montré une réponse locale de type IgA prononcée induite par la flagelline FliC après immunisation par voie intra-péritonéale. Ce switch isotypique induit par la flagelline a déjà été observé dans une précédente étude après immunisation avec la flagelline de *Salmonella* Typhimurium (FLA-ST) par voie intra-

péritonéale (Flores-Langarica *et al.* 2012). De plus dans cette étude nous avons montré que FliC pouvait représenter une alternative intéressante à la TC dont la toxicité chez l'Homme restreint son utilisation aux modèles animaux.

Le mécanisme d'action de la flagelline en tant qu'adjuvant est probablement médié par son interaction avec les récepteurs TLR5 situés à la surface des cellules épithéliales et des cellules dendritiques (Mizel and Bates 2010). Il a notamment été montré que la stimulation des cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> de la lamina propria de la muqueuse intestinale via TLR5, participait à la différenciation de la voie Th17 et induisait la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'IgA (Uematsu *et al.* 2008).

Par ailleurs, nous avons montré chez l'animal que les propriétés adjuvantes de FliC étaient similaires à celles de la TC.

Ainsi, ces résultats suggèrent une utilisation prometteuse dans une stratégie de vaccination par voie muqueuse ciblant *C. difficile*.

1 ***Clostridium difficile* flagellin FliC: evaluation as adjuvant**  
2 **and use in a mucosal vaccine against *Clostridium difficile***

3  
4  
5 Jean-François Bruxelles<sup>1</sup>, Assaf Mizrahi <sup>1,2</sup>, Sandra Hoÿs<sup>1</sup>, Anne Collignon<sup>1</sup>, Claire Janoir<sup>1</sup>,  
6 Séverine Péchiné<sup>1\*</sup>

7  
8  
9 <sup>1</sup> EA4043 Unité Bactéries Pathogènes et Santé (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-  
10 Saclay, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

11 <sup>2</sup> Service de Microbiologie Clinique, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Paris, France

12  
13  
14 \*Corresponding author

15 E-mail: [severine.pechine@u-psud.fr](mailto:severine.pechine@u-psud.fr) (SP)

## 24 **Abstract**

25           The immunogenicity of bacterial flagellin has been reported in different studies. By its  
26 close interaction with the immune system, the flagellin represents an interesting adjuvant and  
27 vaccine candidate. *Salmonella* Typhimurium flagellin has already been tested as adjuvant to  
28 stimulate mucosal immunity. Here, we assessed the ability of *Clostridium difficile* flagellin  
29 FliC to act as a mucosal adjuvant, first combined with ovalbumin as antigen and second with  
30 a *C. difficile* surface protein, the precursor of the S-layer proteins SlpA. Using ovalbumin as  
31 antigen, we compared the gut mucosal adjuvanticity of FliC to *Salmonella* Typhimurium  
32 flagellin and cholera toxin. Two routes of immunization were tested in a mouse model: intra-  
33 rectal and intra-peritoneal, following which, gut mucosal and systemic antibody responses  
34 against ovalbumin (Immunoglobulins G and Immunoglobulins A) were analyzed by Enzyme-  
35 Linked Immuno Assay in intestinal contents and in sera. In addition, ovalbumin-specific  
36 immunoglobulin producing cells were detected in the intestinal lamina propria by Enzyme-  
37 Linked Immunospot. Results showed that FliC as adjuvant for immunization targeting  
38 ovalbumin was able to stimulate a gut mucosal and systemic antibody response independently  
39 of the immunization route. In order to develop a mucosal vaccine to prevent *C. difficile*  
40 intestinal colonization, we assessed in a mouse model the efficacy of FliC as adjuvant  
41 compared with cholera toxin co-administrated with the *C. difficile* S-layer precursor SlpA as  
42 antigen. After challenge, a significant decrease of *C. difficile* intestinal colonization was  
43 observed in immunized groups compared to the control group. Our results showed that *C.*  
44 *difficile* FliC could be used as adjuvant in mucosal vaccination strategy against *C. difficile*  
45 infections.

46  
47  
48

## 50 **Introduction**

51

52 *Clostridium difficile* is an anaerobic spore-forming Gram positive bacterium,  
53 commonly found in the environment and frequently isolated in hospitals. *C. difficile* is an  
54 enteropathogen responsible for diarrhea and pseudomembranous colitis associated to gut  
55 microbiota dysbiosis frequently consecutive to antibiotic therapy in the elderly [1] .

56 European guidelines for treatment of *C. difficile* infection (CDI) consist of the discontinuation  
57 of CDI-inducing antibiotherapy and administration of specific antibiotics depending on the  
58 severity of the disease [2]. However, approximately 20% of treated patients experience  
59 recurrences, and multiple recurrences are frequent [3]. Thus, alternative therapeutic  
60 approaches to antibiotics are required. Among them, fecal microbiota transplantation and  
61 immunotherapy are promising. To prevent recurrences and trigger a long term protection  
62 against CDI, vaccination appears to be a rational strategy [4]. The toxins TcdA and TcdB are  
63 the main virulence factors responsible for the clinical signs. Several vaccines targeting these  
64 toxins are under investigation in clinical trials and seem to show efficacy after parenteral  
65 immunization (clinical trials Sanofi Pasteur NCT01887912, Pfizer NCT03090191). However,  
66 intestinal colonization is the first step of the *C. difficile* pathogenic process; therefore  
67 targeting colonization factors represents an interesting vaccine strategy. Indeed, immunity  
68 induced by this approach will reduce the colonization process of infection, limiting the first  
69 interaction between the bacterium and its host and therefore the faecal shedding of bacteria.  
70 Several studies have shown promising results and identified interesting vaccine candidates  
71 such as the Cwp84 protease and the flagellin FliC [5–7]. The precursor of the S-layer proteins  
72 (SlpA) has already been successfully tested [8–11]. Besides the identification of the antigenic  
73 target, a better knowledge of the protective immune response against *C. difficile* and the

74 respective role of the local and systemic response will improve vaccine development [12].  
75 Moreover, since CDI is strictly located in colonic mucosa, a mucosal immunization appears as  
76 a rational strategy to develop a local intestinal immunity. In addition, for vaccine design, the  
77 choice of the adjuvant related to the administration route is crucial to optimize immune  
78 response [13].

79 Cholera toxin (CT) remains the most commonly used adjuvant for mucosal immunization  
80 assays in animal models [14]. However, the use of CT is not possible in humans [15,16]. As  
81 alternative, several mucosal adjuvants are under investigations such as agonists of pattern  
82 recognition receptors (PRRs) capable of triggering the innate immune system. For instance,  
83 flagellins are known to be pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) harboring a  
84 highly conserved domain involved in Toll-like receptor 5 (TLR5) interaction but also an  
85 antigenic domain variable among species [17–19]. Thus, bacterial flagellins play a crucial role  
86 in triggering innate and adaptive immunity at the systemic level and in mucosa associated  
87 lymphoid tissue (MALT) [20]. Few studies have investigated the adjuvant effect of flagellin  
88 [21]. For instance, *Salmonella* Typhimurium flagellin (FLA-ST), administered either via the  
89 intra-nasal or a parenteral route, has been demonstrated to have an effective adjuvanticity  
90 [22,23]. The interest in *C. difficile* flagellin FliC in vaccination has already been evaluated  
91 since FliC plays a key role in the pathogenesis ranging from bacterial colonization to gene  
92 regulation through immunomodulatory effects [24–28]. FliC immunogenicity has been proven  
93 by the detection of specific antibodies against FliC in CDI patients [29]. This immunogenicity  
94 was recently confirmed by parenteral immunization assays in mice and hamsters with FliC as  
95 antigen [6]. Recently, the interaction between *C. difficile* flagellin FliC and TLR5 was  
96 confirmed *in vitro* and *in vivo* with a similar activity compared to *Salmonella* Typhimurium  
97 flagellin (FLA-ST) [27,30,31]. These results suggest that FliC could also be used as an  
98 adjuvant in mucosal vaccination. An adjuvant able to stimulate the intestinal mucosal immune

99 system and generate secretory Immunoglobulins A (sIgA) production could be essential in the  
100 development of an effective mucosal vaccine directed against enteropathogens such as *C.*  
101 *difficile*.

102 The main objective of this study was to characterize FliC as adjuvant. Firstly, we assessed the  
103 adjuvant property of *C. difficile* flagellin FliC in comparison to FLA-ST and CT using  
104 ovalbumin (OVA) as antigen in mice. We characterized the gut mucosal and systemic  
105 immune response according to adjuvants in immunized mice. Secondly, we confirmed the  
106 efficacy of FliC as an adjuvant when administered with the precursor of the S-layer proteins  
107 SlpA as antigen, in a mouse model of intra-rectal vaccination against *C. difficile* colonization.  
108

## 109 **Materials and Methods**

110

### 111 **FliC and SlpA production**

112 FliC and SlpA recombinant proteins were obtained and purified as previously described  
113 [9,27]. Briefly, the *slpA* and *fliC* genes (from the 630 and UK R20291 *C. difficile* strains,  
114 respectively) were cloned in frame with histidine tags. Then, plasmids were introduced by  
115 transformation into *E. coli* BL21. The SlpA and FliC proteins were obtained after expression  
116 by IPTG and purification by a single-step affinity chromatography using BD Talon cobalt  
117 affinity resin (BD Biosciences). FliC purification steps were verified by SDS-PAGE followed  
118 by Western blot.

119

### 120 **Animal models**

121 Animal assays were performed with six weeks old female C57BL/6 J mice (Charles River's  
122 laboratories France). For blood sampling and intra-rectal (IR) immunizations, mice were

123 anaesthetized by intra-peritoneal (IP) injection of Ketamine 1000 (100mg/Kg), Rompun 2%  
124 (0.25mL/Kg).

125 Protocols involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional  
126 guidelines that are in compliance with national and international laws and policies. All efforts  
127 were made to minimize animal suffering. Animals were humanely euthanized by cervical  
128 dislocation after anesthesia as approved by the Committee on the Ethics of Animal  
129 Experiments n°26 University of Paris-Sud and authorized by the French Ministry of  
130 Research (6164-2016071515415418).

131

## 132 **Vaccination regimen with ovalbumin as antigen**

133 Ovalbumine (OVA) is a commonly used antigen in order to assess adjuvant activity [19,32].  
134 In two distinct assays, a total of fourteen mice per group received intra-rectally (IR) 20µg of  
135 ovalbumin (ovalbumin grade VII, Sigma) with 7µg of adjuvant, either cholera toxin (CT)  
136 (List Biological Laboratories, INC), or FLA-ST (Standard flagellin from *S. Typhimurium*,  
137 Invivogen, France), or purified recombinant FliC. A control group of 14 mice received 20µg  
138 of ovalbumin in phosphate-buffered saline (PBS). In addition, to compare IR (mucosal)  
139 immunization with IP (parenteral) route of immunization with FliC, a group of eight mice  
140 received 20µg of ovalbumin with 7µg of purified recombinant FliC intraperitoneally (IP).  
141 Each group of mice received 3 identical doses: a first one on day 0, a second dose on day 15  
142 and a last dose on day 30. At day 45, mice were humanely euthanized (guidelines of the  
143 "Animal Welfare Committee of the Université Paris Sud") for blood and intestinal content  
144 sampling and cell isolation from intestinal lamina propria.

145

## 146 **Evaluation of the immune response after immunization with** 147 **different adjuvants co-administered with ovalbumin as antigen**



## 148 **Blood and intestinal content collection**

149 Blood samples from all mice were withdrawn under anesthesia by cardiac puncture before  
150 each immunization on days 0, 15, and 30 and before their sacrifice on day 45, fifteen days  
151 after the last immunization. At this time, caecum and colon of each mouse were removed,  
152 opened and washed with 1mL of PBS containing a protease inhibitor cocktail (cOmplete™  
153 Mini, Roche, France). Intestinal contents were treated as already described [10]; briefly they  
154 were clarified by a first centrifugation at 4,000×g for 10 min at (at 4°C), then the supernatant  
155 was centrifuged for 10 min at 12,000×g (at 4°C). The supernatants were collected and stored  
156 at -80°C until analysis.

157

## 158 **Intestinal lamina propria cell isolation**

159 Protocol was adapted from the method described by Weigmann *et al.*[33]. Briefly, caecum  
160 and colon from 5 immunized mice of each group were removed and washed at D45, when  
161 mice were sacrificed. Tissues were cut in small pieces and incubated under shaking at 37°C  
162 for 15 min in a pre-digestion medium and tissues were retained on a 100µm nylon cell  
163 strainer, this pre-digestion was repeated three times (PBS 1X, HEPES 10mM, EDTA 5mM).  
164 Tissues were then digested for 25 min on shaker at 37°C in digestion medium (20ml RPMI,  
165 HEPES 10mM, collagenase type IV 0.25 mg/ml). Digested tissues were disaggregated and  
166 filtered through a 70µm nylon cell strainer. Cells were washed with cell culture medium  
167 (DMEM, fetal calf serum 10%, penicillin 100U/ml, streptomycin 5µg/ml), and cell  
168 suspensions were centrifuged 20 min at 400×g at 4°C and resuspended with 1ml of cell  
169 culture medium. Living cells were counted using trypan blue exclusion test.

170

## 171 **Detection of specific IgA and IgG by ELISA**

172 For each mouse, OVA specific antibody levels in sera and intestinal samples were assessed  
173 using ELISA. Wells of a 96-well microtitre plate (MaxiSorp, Nunc) were coated with 10µg of  
174 OVA in carbonate/bicarbonate buffer pH 9.5. Microplates were washed with PBS/0.01%  
175 Tween 20 and then blocked with PBS/1% BSA (Bovine serum albumin) overnight at 4°C. A  
176 100 µl aliquot of samples (dilution 1:20 for sera and 1:10 for intestinal contents) was added in  
177 each well and microplates were incubated for 30 min at 37°C. After washing, 100 µl of  
178 biotinylated anti-mouse IgG (dilution 1:20,000) or IgA (dilution 1:10,000) antibodies (Sigma)  
179 were added in each well and plates were incubated 30 min at 37°C. Then, after washing, 100  
180 µl of HRP-conjugated streptavidin were added in each well (dilution 1:10,000 Thermo  
181 Scientific) and plates were incubated 30 min at 37°C, and finally, 100 µl of 3,3',5,5'-  
182 tetramethylbenzidine (Sigma) were added in each well as development reagents. The reaction  
183 was stopped by addition of 100 µl of H2SO4 (1N) and the Optical Density (OD) at 450 nm  
184 was determined.

185 All samples were tested in duplicate and treated simultaneously to avoid inter-assay  
186 variations. Assays with antigen in the absence of sera served as negative controls and an OD  
187 two fold greater than the negative control defines the cut-off value [34]. Thus, mice with  
188 samples yielding an OD greater than the cut-off value were reported as positively responding  
189 to the immunization.

190

### 191 **Detection of antigen-specific antibody producing cells by ELISPOT**

192 MultiScreen-HA sterile plates (0.45 µm surfactant-free mixed cellulose ester membrane,  
193 Millipore) were coated over night at 4°C with 50 µl of OVA (5 µg/ml) in sterile PBS pH 7.5.  
194 After two washes with ultra pure water, wells were blocked with 150µl of cell culture medium  
195 for 2h at 37°C. A 100 µl aliquot, containing 50,000 isolated living cells were added per well  
196 in quadruplicate and plates were incubated over night in a cell incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

197 Plates were washed three times with washing buffer (PBS, Tween20 0.01%) and twice with  
198 PBS only. Biotin-conjugated anti mouse IgG or IgA was added at a dilution of 1:2000 and  
199 plates were incubated for 2h at room temperature. After washing, streptavidin-HRP (Thermo  
200 scientific) was added and plates were incubated 30 min at 37°C. After washing, reactions  
201 were detected with 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC, Sigma) in acetate buffer according to  
202 manufacturer's instructions. After 20 min, reaction was stopped by washing abundantly with  
203 water for 2 min [35]. Plates were read using an AID ELISPOT reader. Results were expressed  
204 in Spot Forming Units (SFU) per 10<sup>6</sup> cells.

205

### 206 **Intra-rectal vaccination regimen with SlpA as antigen**

207 One group of 6 mice received intra-rectally 50µg of purified recombinant SlpA and 5µg of  
208 cholera toxin. Another group of 6 mice received intra-rectally 50µg of purified recombinant  
209 SlpA and 5µg of FliC as adjuvant. The control group of 6 mice received intra-rectally 80µl of  
210 PBS. Mice were vaccinated on days 0, 15, 30. At day 45, mice received an antibiotic  
211 treatment in drinking water for seven days. The cocktail of antibiotics was composed of  
212 kanamycin (0.4mg/mL), gentamicin (0.035mg/mL), colistin (850U/mL), metronidazole  
213 (0.215mg/mL), and vancomycin (0.045 mg/mL) [36]. The concentration of the antimicrobial  
214 mixture was calculated based on the average weight of mice and their expected water  
215 consumption. On the third day of treatment (day 48), a dose of clindamycin (10mg/Kg) was  
216 IP-administered. One day after the end of antibiotic treatment (day 53), mice were challenged  
217 by oral administration of 8.10<sup>2</sup> *C. difficile* spores of the 630 strain [37]. Vaccination trials  
218 were performed twice.

219 Spores were prepared as previously described [38]. Briefly, cultures of the 630 toxigenic  
220 strain of *C. difficile* were grown anaerobically at 36°C for 5–7 days, on blood/agar plates. The  
221 cultures were harvested into 10 mL of PBS, were washed in PBS, and were then heat-shocked

222 at 56°C for 10 min. The spores were centrifuged, resuspended in sterile water and conserved  
223 at 4°C until use. Spores were quantified by culture of 10-fold serial dilutions on Columbia  
224 agar plates supplemented with 4% horse blood and sodium taurocholate (0.1%).

225

### 226 ***C. difficile* detection in mouse fecal samples**

227 To assess the intestinal colonization rate of *C. difficile*, fecal pellets from each mouse were  
228 cultured before antibiotic administration to ensure the absence of *C. difficile* before challenge  
229 and daily after *C. difficile* challenge for ten days. Fecal samples were processed as previously  
230 described [10]. Briefly, a fecal suspension of 10 mg/mL in PBS was prepared, and 100µL of  
231 ten-fold serial dilutions were cultured in anaerobiosis on Columbia agar containing 5% of  
232 horse blood, 25% (w/v) of D-cycloserine, and 0.8% (w/v) of cefoxitin and sodium  
233 taurocholate (0.1%). Typical fluorescent colonies were counted under UV light (312 nm). By  
234 this method, the threshold of *C. difficile* detection in animal feces was 10 CFU/mg.

235

### 236 **Statistical analysis**

237 Normality was verified using Kolmogorov-Smirnov test and Shapiro-Wilk test. For normally  
238 distributed data, an unpaired student t-test was used. For non-normally distributed data Mann-  
239 Whitney U-test was used. A p-value  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical  
240 significance.

241

## 242 **Results**

243

244 **Evaluation of the gut mucosal immune response induced by FliC,**  
245 **FLA-ST, CT as adjuvant and OVA as antigen**

246 To compare the gut mucosal adjuvant potency of FliC with already known adjuvants FLA-ST  
247 and CT, we immunized mice with OVA via IR (mucosal) or IP (parenteral) route. Then, we  
248 evaluated and compared the induction of IgA and IgG specific to OVA in the intestinal  
249 contents and sera. In addition, we detected IgA and IgG producing cells in the lamina propria  
250 from mouse colon and ceacum after immunizations.

251  
252 In intestinal contents of IR-immunized mice with FliC as adjuvant, 4 out of 14 mice showed  
253 an anti-OVA IgA response higher than the defined cut-off value (Fig 1A). Despite inter-  
254 individual variation, a significant greater production of OVA specific IgA was observed with  
255 FliC as adjuvant compared to mice immunized with CT ( $p = 0.019$ ) and PBS control mice ( $p$   
256  $= 0.020$ ). However, the OVA specific IgA level remains low for these groups. Despite inter-  
257 individual variation, all IP-immunized mice with FliC as adjuvant presented an anti-OVA IgA  
258 response higher than the cut-off value. IP-immunized mice produced significantly more OVA  
259 specific IgA than IR-immunized mice with FliC ( $p = 0.013$ ), FLA-ST ( $p = 0.033$ ) or CT ( $p =$   
260  $0.025$ ) and PBS control mice ( $p = 0.038$ ).

261 Regarding IgG in intestinal contents, no IR-immunized mice with FliC or FLA-ST as  
262 adjuvant displayed OVA specific IgG in the intestinal lumen higher than the cut-off value.  
263 However, for IR-immunized mice with CT, only 4 out of 14 mice presented an anti-OVA IgG  
264 response higher than the cut-off value and with a significant difference compared to IR-  
265 immunized mice with FliC, FLA-ST and PBS control mice ( $p = 0.016$ ). Of note, IP-  
266 immunized mice with FliC presented significantly more anti-OVA IgG in intestinal contents  
267 than IR-immunized mice whatever the adjuvant used ( $p < 0.001$ ) (Fig 1B).

268

269 **Fig. 1: Anti-OVA antibody levels in intestinal contents of immunized mice.** Immunization  
270 by intra-rectal route with ovalbumin as antigen (OVA), with cholera toxin (CT) (n=14),  
271 *Salmonella* Typhimurium flagellin (FLA-ST) (n=14), *C. difficile* flagellin (FliC) (n=14)  
272 respectively as adjuvant and PBS administration for the control group (n=14). Immunization  
273 by intra-peritoneal route with OVA as antigen and FliC as adjuvant (FliC IP) (n=8). (A) Anti-  
274 OVA IgA level; (B) anti-OVA IgG level. \*: statistically significant difference \*:  
275  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$  (student t-test). Dotted-line corresponds to the  
276 cut-off value.

277

278 To further complete the characterization of the induced local immune response, we also  
279 detected antibody producing cells specific to OVA in the intestinal lamina propria.

280 We looked at anti-OVA IgA producing cells in the intestinal lamina propria: for IR-  
281 immunized mice, no significant difference compared to the PBS control was observed  
282 independently of the adjuvant. In contrast, IP-immunized mice with FliC displayed  
283 significantly more anti-OVA IgA producing cells than IR-immunized mice ( $p = 0.040$ ) (fig  
284 2A).

285 Concerning anti-OVA IgG producing cells in the intestinal lamina propria, despite important  
286 inter-individual variation, significantly more cells were detected in IR- and IP-immunized  
287 mice with FliC as adjuvant compared to PBS control ( $p = 0.041$ ,  $p = 0.014$  respectively) (Fig  
288 2B). No significant difference was observed between mice IR-immunized with CT or FLA-ST  
289 and PBS control.

290

291 **Fig. 2: Number of antibody producing cells specific to OVA in the intestinal lamina**  
292 **propria of immunized mice expressed in spot forming units (SFUs).** Immunization by  
293 intra-rectal route with ovalbumin as antigen (OVA), with cholera toxin (CT) (n=5),

294 *Salmonella* Typhimurium flagellin (FLA-ST) (n=5), *C. difficile* flagellin (FliC) (n=5)  
295 respectively as adjuvant and PBS administration for the control group (n=5). Immunization by  
296 intra-peritoneal route with OVA as antigen and FliC as adjuvant (FliC IP) (n=5). (A) Anti-  
297 OVA IgA producing cells count; (B) anti-OVA IgG producing cells count \*: statistically  
298 significant difference  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test).

299

### 300 **Evaluation of the systemic immune response induced by FliC,** 301 **FLA-ST, CT as adjuvant and OVA as antigen**

302 At the systemic level, the three adjuvants tested were able to induce an OVA specific IgG  
303 response compared to the PBS control group (Fig 3). However, three immunizations were  
304 needed via the IR route, whereas only two were sufficient via the IP route with FliC as  
305 adjuvant. The intensity of the induced response was different according to adjuvant. At day  
306 45, IR-immunized mice with CT as adjuvant presented a significant greater level of OVA  
307 specific IgG than IR-immunized mice with either FLA-ST or FliC ( $p < 0.001$ ). Interestingly,  
308 FliC IR-immunization induced a significantly higher level of OVA-specific IgG than FLA-ST  
309 ( $p = 0.048$ ). However, the highest level of OVA-specific IgG in sera was observed in IP-  
310 immunized mice with FliC as adjuvant, with a significant difference compared to IR-  
311 immunized with FliC as adjuvant ( $p = 0.0069$ ).

312

313 **Fig. 3: Anti-OVA IgG level in sera of immunized mice.** Immunization by intra-rectal route  
314 with ovalbumin as antigen (OVA), with cholera toxin (CT) (n=14), *Salmonella* Typhimurium  
315 flagellin (FLA-ST) (n=14), *C. difficile* flagellin (FliC) (n=14) respectively as adjuvant and  
316 PBS administration for the control group (n=14). Immunization by intra-peritoneal route with  
317 OVA as antigen and FliC as adjuvant (FliC IP) (n=8). D0: before immunization, D15: first  
318 immunization, D30: first boost, D45: second boost. \*: statistically significant difference \*:

319 0.01 <  $p$  < 0.05; \*\*: 0.001 <  $p$  < 0.01; \*\*\*:  $p$  < 0.001 (student t-test). Dotted-line corresponds to  
320 the cut-off value.

321

## 322 **Intra-rectal vaccination against *C. difficile* colonization using FliC** 323 **as adjuvant and SlpA as antigen**

324 In order to develop a mucosal vaccine to prevent *C. difficile* intestinal colonization, we tested  
325 the ability of FliC as mucosal adjuvant co-administrated with SlpA as antigen in a mouse  
326 model of infection against *C. difficile* colonization. Mice were IR-vaccinated with SlpA either  
327 with CT or FliC as adjuvant. The control group received only PBS. Then, mice were  
328 challenged with the virulent *C. difficile* strain 630. As shown in Fig 4, from day 4 after  
329 challenge to day 10, the *C. difficile* fecal bacterial count was always lower in the vaccinated  
330 groups than in the control group. At day 10, the difference between vaccinated mice and non-  
331 vaccinated mice was statistically significant ( $p < 0,002$ ).

332

333 **Fig. 4: *C. difficile* colonization in vaccinated mice after challenge.** *C. difficile* count from  
334 day 1 to day 10 in feces of mice intra-rectally vaccinated with SlpA as antigen and FliC  
335 (n=12) or CT (n=12) as adjuvant compared to control group (n=12). \*: statistically significant  
336 difference between the control and vaccinated groups  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test).

337

## 338 **Discussion**

339 In this study, we assessed the adjuvant property of *C. difficile* flagellin FliC in  
340 comparison to flagellin FLA-ST and CT, using OVA as antigen in mice. Then, we tested *C.*  
341 *difficile* flagellin FliC as adjuvant as an alternative to CT in IR vaccination strategy against *C.*  
342 *difficile*.



343 Many studies have described the adjuvant property of flagellin inducing both mucosal and  
344 systemic immunity in the context of a broad range of recombinant vaccines administered via  
345 the intra-nasal route or a parenteral route in animal models [23]. Strindelius *et al.* showed that  
346 immunization with the flagellin of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis alone via the oral  
347 route was able to induce a systemic IgM-IgG response and a specific mucosal IgA response in  
348 the intestine [21]. Recently, Ghose *et al.* approached the question of *C. difficile* flagellin  
349 adjuvanticity in animal models via a parenteral route using an antigenic cocktail composed of  
350 receptor binding domains of TcdA and TcdB toxins [6]. They observed a significant increase  
351 of anti-TcdA specific IgG in sera of the FliC-adjuvanted mouse group compared to the non  
352 adjuvanted group. Of note, no difference in anti-TcdB IgG production was observed. For  
353 these authors, TcdA as vaccine candidate could also partially acts as an adjuvant. To our  
354 knowledge, the adjuvanticity of *C. difficile* flagellin FliC has not yet been studied via mucosal  
355 immunization.

356 In this study, we assessed mucosal and systemic FliC adjuvanticity after IR- and IP-  
357 immunization by evaluating the gut mucosal OVA specific IgA and IgG response and in  
358 parallel the systemic OVA specific IgG response. We showed that *C. difficile* flagellin FliC,  
359 used as adjuvant, was able to promote a gut mucosal and systemic OVA specific antibody  
360 response.

361  
362 According to the route of immunization, FliC as adjuvant can induce a local antigen (Ag)  
363 specific IgA response in intestinal mucosa at different levels and with important inter-  
364 individual variations. Only a few IR-immunized mice with FliC showed a weak positive Ag-  
365 specific IgA response (4/14, 29%). The number of Ag-specific IgA producing cells in the  
366 intestinal lamina propria was significantly greater for IP-immunized mice than for IR-  
367 immunized mice. This was correlated with a significant higher Ag-specific IgA level in

368 intestinal content of IP-immunized mice with FliC than IR-immunized mice with FliC and  
369 control mice. Taken together, these results showed that IP-immunization with FliC allows a  
370 full Ag-specific IgA response.

371 Flores-Langarica *et al.* showed that IP-immunization with FLA-ST resulted in a pronounced  
372 IgA switching of FLA-ST-specific B cells in mesenteric lymph nodes four days after boost  
373 [39]. In comparison, in our study, IgA antibody producing cells were isolated in the intestinal  
374 lamina propria 15 days after a second boost.

375 This local IgA response was associated with a local Ag-specific IgG response. All IP-  
376 immunized mice with FliC developed a gut mucosal Ag-specific IgG response as attested by  
377 anti-OVA IgG level in intestinal contents and the presence of anti-OVA IgG producing cells  
378 in the intestinal lamina propria. Surprisingly, Ag-specific IgG were detected only in intestinal  
379 content of IP-immunized mice although Ag-specific IgG producing cells in lamina propria  
380 were present after IP and IR immunization with FliC.

381 Independently of the route of administration, the local antibody response induced by FliC as  
382 adjuvant was associated with a systemic response as attested by the presence of Ag-specific  
383 IgG in immunized mouse sera. As expected, this IgG response was greater with IP-  
384 immunization compared to IR-immunization. Of note, IR-immunized mice with FliC  
385 presented significantly more circulating Ag-specific IgG compared to mice immunized with  
386 FLA-ST.

387 It should be noted that the detection of immunoglobulins by ELISA reflects a global  
388 production whereas antibody producing cell detection by ELISPOT corresponds to a cell  
389 number at a specific time point. However, the discrepancy between the number of Ag-specific  
390 antibody producing cells in intestinal lamina propria and the antibody level in intestinal  
391 content may suggest that IR and IP immunizations induce different immune responses and at  
392 different levels. For instance, Fougeron *et al.* showed that the intranasal adjuvant activity of

393 flagellin is linked to the indirect activation of lung dendritic cells but not via TLR5-mediated  
394 signaling from the epithelial cells [22]. In contrast, Kinnebrew *et al.* showed that flagellin  
395 immunization by parenteral route directly stimulates TLR5 signaling in lamina propria  
396 dendritic cells [40]. The presence of Ag-specific IgG in the intestinal contents could be  
397 explained by a high systemic induced response and the passive diffusion or FcRn-mediated  
398 transport of IgG through the epithelium [41]. Here, IR immunization with FliC induced a low  
399 IgG response locally despite the presence of Ag-specific IgG producing cells. This is in  
400 accordance with the low level of IgG in sera and the need of three immunizations to induce a  
401 significant IgG response. In contrast, IP immunization can induce a strong systemic IgG  
402 response, attested by the presence of Ag-specific IgG producing cells in intestinal lamina  
403 propria, the high level of Ag-specific IgG in sera and the need of only two immunizations to  
404 induce an IgG response.

405

406 The slight differences of immune response induced by FliC and FLA-ST after IR-  
407 immunization could be explained by their origin. Although TLR5 binding domain is highly  
408 conserved, the hypervariable domains of FLA-ST and FliC are different. Nempont *et al.*  
409 showed that the hypervariable domain of flagellin is essential to trigger systemic innate  
410 immunity but not to stimulate the mucosal innate immunity and adjuvanticity to foreign  
411 antigens, suggesting distinct mechanisms of induction in systemic and mucosal compartments  
412 [19].

413 Adjuvant capacity of CT and flagellins derives from different mechanisms. Indeed CT is not a  
414 TLR-agonist, and is internalized through the glycosphingolipid GM1-ganglioside receptor.  
415 CT has been widely experimentally used as mucosal adjuvant in animals and several studies  
416 have investigated the adjuvanticity of CT in many different vaccination regimens and animal  
417 models. After oral immunization, CT has been shown to: i) increase permeability of the

418 intestinal epithelium leading to enhance uptake of co-administered antigen thus facilitating  
419 antigen presentation by a variety of cell types; ii) promote isotype differentiation in B cells  
420 leading to increased IgA production; iii) induce complex stimulation as well as inhibition  
421 effects on T-cell proliferation and cytokine production [42–44]. In our study, after IR-  
422 immunization with CT, we observed a higher IgG systemic response than those obtained in  
423 FliC, FLA-ST and PBS control groups. Surprisingly, this systemic response was not  
424 associated with a local IgA response. In particular, we observed a greater level of Ag-specific  
425 IgA in intestinal content after immunization with FliC than CT as adjuvant.

426 In order to develop a vaccine against *C. difficile* administered by mucosal route, CT has  
427 proved efficacy as adjuvant in IR vaccination assays against *C. difficile* [5,9–11]. However,  
428 bacterial flagellin represents a potential good alternative as adjuvant since it seems to be safe  
429 and effective administered via a mucosal route and at very low dose as attested in mouse [21]  
430 and in non-human primate models [45,46]. In addition, it has been reported that flagellin  
431 seems to be effective as adjuvant in the aged mouse immune system, which is promising for a  
432 vaccine targeting the elderly such as *C. difficile* vaccine.

433 As FliC seems to be a promising adjuvant, we tested it as an alternative to CT in mucosal  
434 vaccination strategy against *C. difficile*. Thus, we compared FliC and CT as adjuvant IR-  
435 administered with a surface protein of *C. difficile* (SlpA) involved in gut colonization as  
436 antigen [9]. Immunized mice were less colonized than non-immunized mice with a significant  
437 difference at day 10. Despite a different systemic antibody response between the two  
438 adjuvanted groups (significant higher level of seric SlpA specific IgG in CT group compared  
439 to FliC group; S1 Figure), the two groups of mice displayed the same kinetics of gut  
440 colonization by *C. difficile*. This suggests the potential role of gut mucosal IgA response in  
441 addition to systemic IgG response in FliC immunized mice. In this study, CT and FliC  
442 showed the same efficacy. These results suggest that *C. difficile* flagellin FliC could be used

443 as adjuvant in mucosal vaccine strategy against CDI targeting colonization factors as an  
444 alternative to CT, which has no perspective of use in human vaccination.

445

## 446 **Acknowledgements**

447 We would like to thank Marion Espeli and Nagham Alouche for their valuable advice and  
448 help in ELISPOT assays.

449

## 450 **References**

451

- 452 1. Monaghan TM. New perspectives in *Clostridium difficile* disease pathogenesis. *Infect Dis Clin North Am.*  
453 2015 Mar;29(1):1–11.
- 454 2. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases:  
455 update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014  
456 Mar;20 Suppl 2:1–26.
- 457 3. Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, Stephens J, Shelbaya A, Haider S. Clinical and economic burden  
458 of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. *J*  
459 *Hosp Infect.* 2012 May;81(1):1–14.
- 460 4. Kociolek LK, Gerding DN. Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile*  
461 infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016 Mar;13(3):150–60.
- 462 5. Péchiné S, Denève C, Le Monnier A, Hoys S, Janoir C, Collignon A. Immunization of hamsters against  
463 *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol.*  
464 2011 Oct;63(1):73–81.
- 465 6. Ghose C, Eugenis I, Sun X, Edwards AN, McBride SM, Pride DT, et al. Immunogenicity and protective  
466 efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein FliC. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Feb  
467 3;5:e8.
- 468 7. Sandolo C, Péchiné S, Le Monnier A, Hoys S, Janoir C, Coviello T, et al. Encapsulation of Cwp84 into  
469 pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011  
470 Nov;79(3):566–73.
- 471 8. Mizrahi A, Collignon A, Péchiné S. Passive and active immunization strategies against *Clostridium*  
472 *difficile* infections: state of the art. *Anaerobe.* 2014 Dec;30:210–9.
- 473 9. Bruxelles J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S. Immunogenic properties of the surface  
474 layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models. *Anaerobe.* 2016  
475 Feb;37:78–84.

- 476 10. Péchiné S, Janoir C, Boureau H, Gleizes A, Tsapis N, Hoys S, et al. Diminished intestinal colonization by  
477 *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of  
478 *Clostridium difficile*. *Vaccine*. 2007 May 16;25(20):3946–54.
- 479 11. Péchiné S, Hennequin C, Boursier C, Hoys S, Collignon A. Immunization using GroEL decreases  
480 *Clostridium difficile* intestinal colonization. *PloS One*. 2013;8(11):e81112.
- 481 12. Ghose C, Kelly CP. The prospect for vaccines to prevent *Clostridium difficile* infection. *Infect Dis Clin*  
482 *North Am*. 2015 Mar;29(1):145–62.
- 483 13. Srivastava A, Gowda DV, Madhunapantula SV, Shinde CG, Iyer M. Mucosal vaccines: a paradigm shift in  
484 the development of mucosal adjuvants and delivery vehicles. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol*  
485 *Scand*. 2015 Apr;123(4):275–88.
- 486 14. Aoshi T. Modes of Action for Mucosal Vaccine Adjuvants. *Viral Immunol* [Internet]. 2017 Apr 24;  
487 Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2017.0026>
- 488 15. Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. *Vaccine*. 2005 Mar 7;23(15):1804–13.
- 489 16. Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric  
490 infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev*. 1983 Dec;47(4):510–50.
- 491 17. Yoon S -i., Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, et al. Structural Basis of  
492 TLR5-Flagellin Recognition and Signaling. *Science*. 2012 Feb 17;335(6070):859–64.
- 493 18. Yoshioka K, Aizawa S, Yamaguchi S. Flagellar filament structure and cell motility of *Salmonella*  
494 typhimurium mutants lacking part of the outer domain of flagellin. *J Bacteriol*. 1995 Feb;177(4):1090–3.
- 495 19. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard J-C. Deletion of flagellin's hypervariable  
496 region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity.  
497 *J Immunol*. 2008 Aug 1;181(3):2036–43.
- 498 20. Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune  
499 responses in mucosa. *Trends Microbiol*. 2004 Nov;12(11):509–17.
- 500 21. Strindeliu L, Filler M, Sjöholm I. Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces  
501 systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. *Vaccine*. 2004 Sep 9;22(27–28):3797–808.
- 502 22. Fougereon D, Van Maele L, Songhet P, Cayet D, Hot D, Van Rooijen N, et al. Indirect Toll-like receptor 5-  
503 mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in  
504 the respiratory tract. *Vaccine*. 2015 Jun 26;33(29):3331–41.
- 505 23. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol Baltim Md*  
506 *1950*. 2010 Nov 15;185(10):5677–82.
- 507 24. Barketi-Klai A, Monot M, Hoys S, Lambert-Bordes S, Kuehne SA, Minton N, et al. The flagellin FliC of  
508 *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during in vivo infection. *PLoS ONE*.  
509 2014 May 19;9(5):e96876.
- 510 25. Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of  
511 *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7937–40.
- 512 26. Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins,  
513 FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun*. 2011 Oct;79(10):4061–7.
- 514 27. Batah J, Denève-Larrazet C, Jolivot P-A, Kuehne S, Collignon A, Marvaud J-C, et al. *Clostridium difficile*  
515 flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in epithelial cells. *Anaerobe*. 2016  
516 Apr;38:116–24.

- 517 28. Stevenson E, Minton NP, Kuehne SA. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. Trends  
518 Microbiol. 2015 May;23(5):275–82.
- 519 29. Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, et al. Immunological properties  
520 of surface proteins of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol. 2005 Feb;54(Pt 2):193–6.
- 521 30. Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, et al. *Clostridium difficile*  
522 flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via  
523 TLR5. Life Sci. 2013 Feb 27;92(3):211–7.
- 524 31. Batah J, Kobeissy H, Pham PTB, Denève-Larrazet C, Kuehne S, Collignon A, et al. *Clostridium difficile*  
525 flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins.  
526 Sci Rep. 2017 Jun 12;7(1):3256.
- 527 32. Shen Y, Chen L, Wang M, Lin D, Liang Z, Song P, et al. Flagellar hooks and hook protein FlgE  
528 participate in host microbe interactions at immunological level. Sci Rep. 2017 May 3;7(1):1433.
- 529 33. Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, Neurath MF. Isolation and subsequent analysis of  
530 murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. Nat Protoc. 2007 Oct;2(10):2307–11.
- 531 34. Lardeux F, Torrico G, Aliaga C. Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis  
532 method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls. Mem  
533 Inst Oswaldo Cruz. 2016 Aug;111(8):501–4.
- 534 35. Natt J, Espéli M. Assessing T follicular helper cell function in vivo: antigen-specific B cell response to  
535 hapten and affinity maturation. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2015;1291:87–101.
- 536 36. Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, Nanthakumar N, Cheknis A, Gerding DN, et al. A mouse model of  
537 *Clostridium difficile*-associated disease. Gastroenterology. 2008 Dec;135(6):1984–92.
- 538 37. Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP. Reconsidering the sporulation characteristics of  
539 hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027. PloS One. 2011;6(9):e24894.
- 540 38. Sambol SP, Tang JK, Merrigan MM, Johnson S, Gerding DN. Infection of Hamsters with  
541 Epidemiologically Important Strains of *Clostridium difficile*. J Infect Dis. 2001 Jun 15;183(12):1760–6.
- 542 39. Flores-Langarica A, Marshall JL, Hitchcock J, Cook C, Jobanputra J, Bobat S, et al. Systemic flagellin  
543 immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T cell and IgA  
544 responses in the mesenteric lymph node. J Immunol Baltim Md 1950. 2012 Dec 15;189(12):5745–54.
- 545 40. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM, et al. Interleukin 23 production  
546 by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate  
547 immune defense. Immunity. 2012 Feb 24;36(2):276–87.
- 548 41. Stapleton NM, Einarsdóttir HK, Stemerding AM, Vidarsson G. The multiple facets of FcRn in immunity.  
549 Immunol Rev. 2015 Nov;268(1):253–68.
- 550 42. Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant: an accelerator in protective immunity and a break in  
551 autoimmunity. Vaccines. 2015 Jul 24;3(3):579–96.
- 552 43. Lavelle EC. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. Cell Mol Life Sci  
553 CMLS. 2005 Dec 1;62(23):2750–70.
- 554 44. Aoshi T. Modes of Action for Mucosal Vaccine Adjuvants. Viral Immunol. 2017 Apr 24;
- 555 45. Weimer ET, Ervin SE, Wozniak DJ, Mizel SB. Immunization of young African green monkeys with OprF  
556 epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies  
557 against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2009 Nov 12;27(48):6762–9.

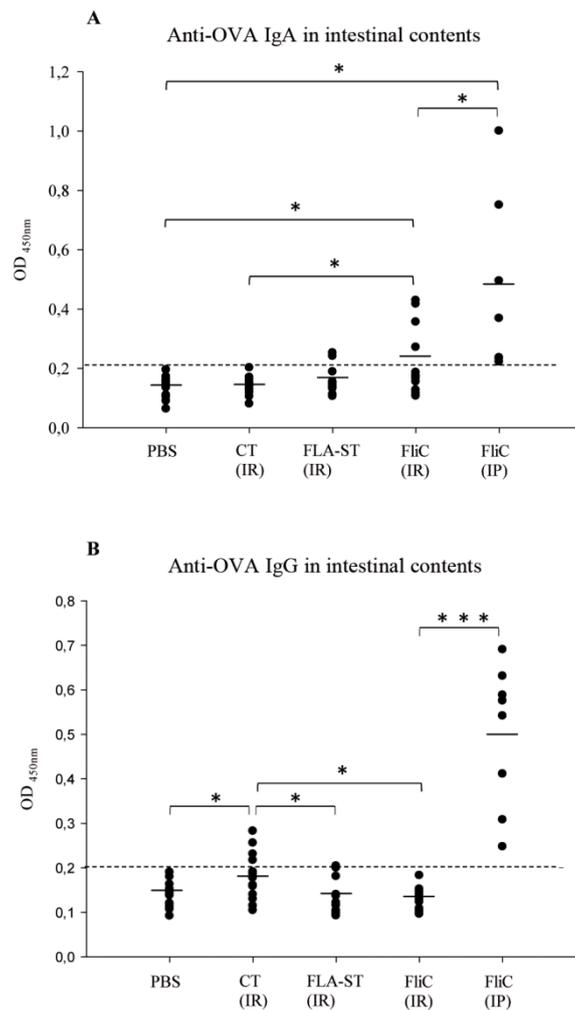
558 46. Bates JT, Honko AN, Graff AH, Kock ND, Mizel SB. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice.  
559 Mech Ageing Dev. 2008 May;129(5):271–81.

560

## 561 **Supporting information**

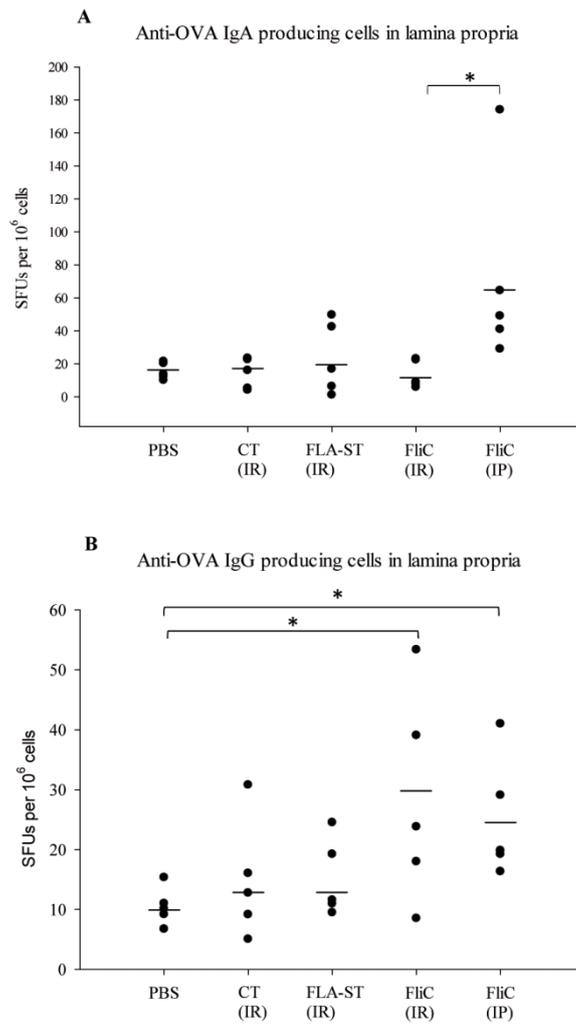
562 **S1Fig. Anti-SlpA IgG level in sera of immunized mice.** Immunization by intra-rectal route  
563 with SlpA as antigen and with cholera toxin (CT) (n=12) or C. difficile flagellin (FliC) (n=12)  
564 as adjuvant. D0 : before immunization, D45 : after the last immunization. \* statistically  
565 significant difference  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test).  
566



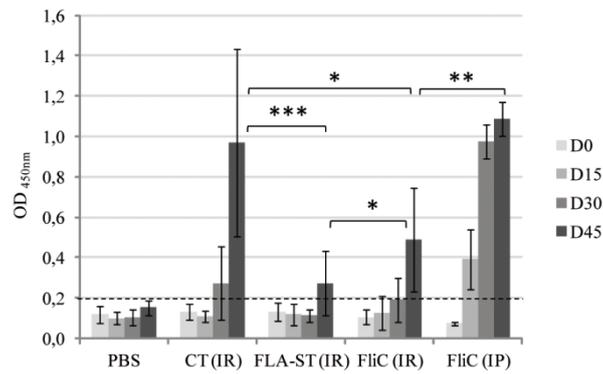


**Fig. 1: Anti-OVA antibody levels in intestinal contents of immunized mice.**

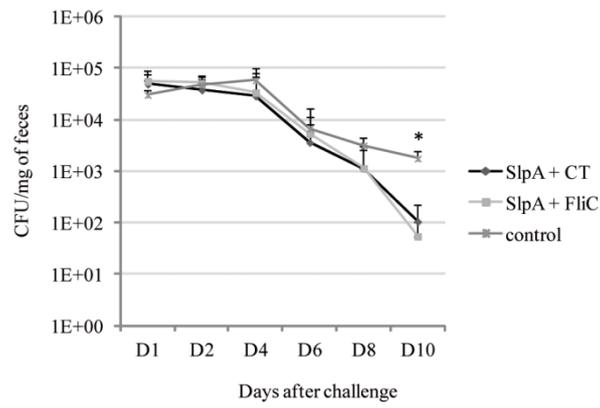
Immunization by intra-rectal route with ovalbumin as antigen (OVA), with cholera toxin (CT) (n=14), *Salmonella* Typhimurium flagellin (FLA-ST) (n=14), *C. difficile* flagellin (FliC) (n=14) respectively as adjuvant and PBS administration for the control group (n=14). Immunization by intra-peritoneal route with OVA as antigen and FliC as adjuvant (FliC IP) (n=8). (A) Anti-OVA IgA level; (B) anti-OVA IgG level. \*: statistically significant difference  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$  (student t-test). Dotted-line corresponds to the cut-off value.



**Fig. 2: Number of antibody producing cells specific to OVA in the intestinal lamina propria of immunized mice expressed in spot forming units (SFUs).** Immunization by intra-rectal route with ovalbumin as antigen (OVA), with cholera toxin (CT) (n=5), *Salmonella* Typhimurium flagellin (FLA-ST) (n=5), *C. difficile* flagellin (FliC) (n=5) respectively as adjuvant and PBS administration for the control group (n=5). Immunization by intra-peritoneal route with OVA as antigen and FliC as adjuvant (FliC IP) (n=5). (A) Anti-OVA IgA producing cells count; (B) anti-OVA IgG producing cells count \*: statistically significant difference  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test).

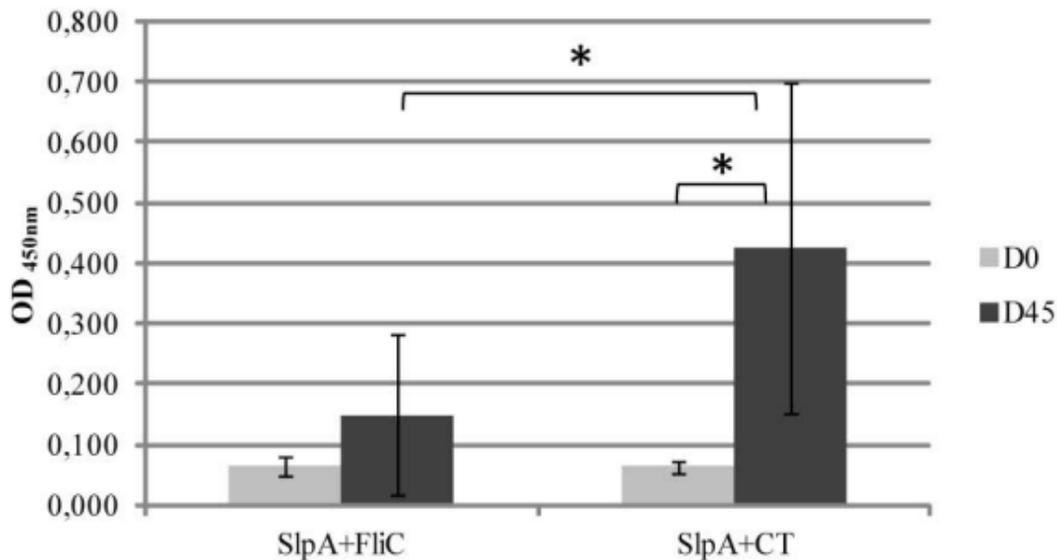


**Fig. 3: Anti-OVA IgG level in sera of immunized mice.** Immunization by intra-rectal route with ovalbumin as antigen (OVA), with cholera toxin (CT) (n=14), *Salmonella* Typhimurium flagellin (FLA-ST) (n=14), *C. difficile* flagellin (FliC) (n=14) respectively as adjuvant and PBS administration for the control group (n=14). Immunization by intra-peritoneal route with OVA as antigen and FliC as adjuvant (FliC IP) (n=8). D0: before immunization, D15: first immunization, D30: first boost, D45: second boost. \*: statistically significant difference \*:  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$  (student t-test). Dotted-line corresponds to the cut-off value.



**Fig. 4: *C. difficile* colonization in vaccinated mice after challenge.** *C. difficile* count from day 1 to day 10 in feces of mice intra-rectally vaccinated with SlpA as antigen and FliC (n=12) or CT (n=12) as adjuvant compared to control group (n=12). \*: statistically significant difference between the control and vaccinated groups  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test).

## IgG response anti-SlpA in sera



**Figure S1. Anti-SlpA IgG level in sera of immunized mice.** Immunization by intra-rectal route with SlpA as antigen and with cholera toxin (CT) (n=12) or *C. difficile* flagellin (FliC) (n=12) as adjuvant. D0: before immunization, D45: after the last immunization. \*: statistically significant difference  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test)

## **2.2. Article 4: Efficient protection against *Clostridium difficile* by oral vaccination using flagellin FliC-loaded pectin beads in a hamster model**

En cours de soumission.

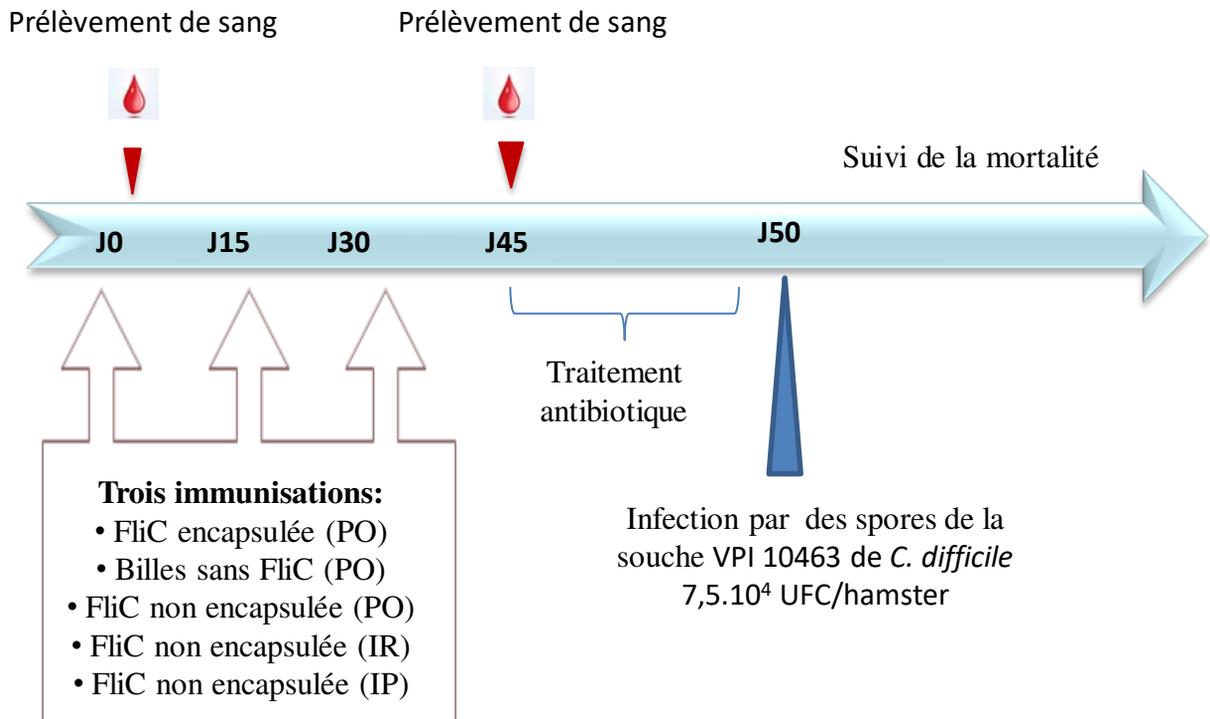
### **Présentation de l'article.**

Des essais préliminaires réalisés au laboratoire ont montré que parmi les différentes voies muqueuses d'immunisation, la voie intra-rectale est celle qui permettait l'induction d'une réponse immunitaire humorale aussi bien locale que systémique. C'est pourquoi la voie d'administration intra-rectale a été utilisée chez l'animal afin d'évaluer l'intérêt d'un candidat vaccin par voie muqueuse. Cependant, chez l'Homme, la voie intra-rectale ne semble pas être une voie d'avenir. Ainsi, notre objectif était de remplacer la voie intra-rectale par la voie orale. Pour cela, il est nécessaire de développer une méthode d'administration des antigènes vaccinaux susceptible de les protéger d'une dégradation éventuelle lors du passage gastrique.

*C. difficile* étant un entéropathogène non invasif, l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse au plus près du site d'infection au niveau du colon semble être la meilleure solution. Pour cela, l'antigène doit être vectorisé afin de permettre une libération colique. La pectine est un bio-polymère permettant d'encapsuler l'antigène vaccinal et de le libérer spécifiquement au niveau du colon grâce à une dégradation de la pectine par les pectinases produites par le microbiote colique.

La protéine FliC a déjà été utilisée avec succès dans des immunisations par voie intrapéritonéale (Ghose *et al.* 2016b). Après avoir testé son potentiel adjuvant nous voulions nous intéresser à son utilisation en tant qu'antigène vaccinal pour des immunisations par voie muqueuse.

En collaboration avec l'équipe du Pr Elias Fattal de l'Institut Galien (Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612), nous avons ici, dans un modèle hamster, évalué l'efficacité d'une vaccination par voie orale en utilisant FliC comme antigène encapsulé dans des billes de pectine pour une libération colique et l'induction d'une réponse immune et d'une protection contre *C. difficile*.



**Figure 20.** Protocole de vaccination avec FliC par voies muqueuse et parentérale contre les infections à *C. difficile* dans un modèle hamster.

PO: per os

IR: voie intra-rectale

IP: voie intra-péritonéale

Dans un premier temps, nous avons encapsulé FliC dans des billes de pectine et vérifié l'efficacité de l'encapsulation. Puis nous avons analysé la libération *in vitro* de la protéine encapsulée dans un milieu intestinal et dans un milieu colique simulés.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un essai d'immunisation dans un modèle hamster (Figure 20). Cinq groupes de six hamsters ont reçu à trois reprises : par voie orale soit des billes de pectine sans antigène dans une gélule gastrorésistante, soit des billes contenant FliC dans une gélule gastrorésistante, soit FliC non encapsulée. Par voie intra-rectale ou intra-péritonéale les hamsters ont reçu FliC non encapsulée. Avant et après immunisation, un échantillon de sang de chaque hamster a été prélevé pour analyser la réponse immunitaire induite de type anticorps spécifique anti-FliC. Après immunisation, les hamsters ont reçu un traitement antibiotique pour altérer le microbiote intestinal, puis ont été infectés par *C. difficile*. La survie des animaux a été suivie.

## **Principaux résultats.**

L'efficacité d'encapsulation de FliC dans les billes de pectine était d'environ 30%. *In vitro* les billes ont montré une forte capacité de rétention de FliC dans un milieu intestinal simulé alors que dans un milieu colique en présence d'enzymes pectinolytiques la flagelline FliC était rapidement et totalement libérée.

L'immunisation par voie orale avec la flagelline FliC encapsulée dans les billes de pectine a permis d'induire 50 % de protection des hamsters contre la mortalité induite par *C. difficile*. En revanche, aucune protection n'était observée dans le groupe immunisé par voie orale avec FliC non encapsulée. Une protection partielle de 33% a été observée dans le groupe immunisé avec FliC par voie intra-péritonéale mais cette protection n'était pas significativement différente de celle obtenue par immunisation par voie intra-rectale (17%) ni de celle obtenue pour le groupe contrôle immunisé avec les billes blanches (17%). L'analyse de la réponse immunitaire induite au niveau systémique a montré une production d'anticorps sériques spécifiques de FliC uniquement pour le groupe immunisé par voie intra-péritonéale.



## Discussion et conclusion.

L'utilisation de FliC comme antigène vaccinal par voie intra-péritonéale dans le modèle hamster a précédemment été décrite avec un taux de protection de 43% proche de celui obtenu dans notre étude (Ghose *et al.* 2016b). Cependant, dans notre étude, nous avons pour la première fois montré l'efficacité d'une administration de FliC par voie orale pour lutter contre les ICD dans un modèle hamster. Par ailleurs, nous avons démontré la nécessité de la vectorisation de FliC pour son utilisation par voie orale. Dans cette étude, la flagelline FliC a été encapsulée dans des billes de pectine pour permettre une libération colique. Cette stratégie a permis d'induire un taux de protection (50%) contre l'infection à *C. difficile* significatif par rapport à une administration de FliC non encapsulée par voie orale. Cependant, ce taux de protection n'était pas corrélé à la production d'anticorps circulant anti-FliC (IgG-A-M), puisque seuls les hamsters immunisés par voie intra-péritonéale ont développé une réponse humorale sérique. Ceci suggère l'intervention d'un autre mécanisme de protection, qui pourrait être l'induction d'une réponse locale de type IgA. Par ailleurs, Jarchum *et al.* ont montré dans un modèle souris que l'injection par voie intra-péritonéale de flagelline de *Salmonella* (FLA-ST) un jour avant et un jour après administration de *C. difficile* toxigène induisait une protection contre l'ICD. L'administration prophylactique de la flagelline permettrait ainsi l'induction d'une réponse immunitaire innée, le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et réduirait ou retarderait la colonisation par *C. difficile* dans le colon (Jarchum *et al.* 2011). Par ailleurs, notre étude a permis de confirmer la forte immunogénicité de FliC, puisque son administration seule par voie intra-péritonéale sans adjuvant complémentaire a permis d'induire une réponse humorale spécifique.

Enfin, nous avons confirmé l'efficacité de l'utilisation de bio-polymères tels que la pectine dans une stratégie de vaccination par voie orale contre les ICD.

Pour conclure, la flagelline FliC représente un candidat vaccin prometteur, mais comme pour le précurseur SlpA, elle ne semble pas suffire pour induire une protection totale. Par ailleurs, cette étude montre les limites d'une réponse humorale systémique anti-FliC et suggère l'importance de la réponse immunitaire locale et/ou innée dans la protection contre les ICD.

# Efficient protection against *Clostridium difficile* by oral vaccination using flagellin FliC-loaded pectin beads in a hamster model.

JF. Bruxelles<sup>1</sup>, N. Tsapis<sup>2</sup>, S. Hoys<sup>1</sup>, C. Janoir<sup>1</sup>, A. Collignon<sup>1</sup>, E. Fattal<sup>2</sup>, S. Péchiné<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> EA4043 Unités Bactéries Pathogènes et Santé (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup> Institut Galien Paris-Sud, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

## \* Correspondence:

Séverine Péchiné

severine.pechine@u-psud.fr

**Keywords:** *Clostridium difficile*<sub>1</sub>, oral vaccination<sub>2</sub>, flagellin<sub>3</sub>, pectin beads<sub>4</sub>, colonic delivery<sub>5</sub>

## Abstract

*Clostridium difficile* flagellin FliC is a highly immunogenic pathogen-associated molecular pattern playing a key role in *C. difficile* pathogenesis and gut colonization. Here, we designed an oral vaccine against *C. difficile* with FliC encapsulated into pectin beads for colonic release. Beads stability and FliC retention were confirmed *in vitro* in simulated intestinal medium. Then, in simulated colonic medium, beads degraded and FliC was fully released. The importance of FliC encapsulation into pectin beads for protection against *C. difficile* was assessed in a vaccination assay using a hamster lethal-model of *C. difficile* infection. Three groups of hamsters orally received either, FliC-loaded beads or unloaded beads in gastro-resistant capsule to limit gastric degradation or free FliC. Two other groups were immunized with free FliC, one intra-rectally and the other intra-peritoneally. Hamsters were then challenged with a lethal dose of *C. difficile*. All hamsters immunized with free FliC died within 7 days post challenge whereas 50% of hamster immunized with FliC-loaded beads survived. No significant protection was observed in other groups. Only intra-peritoneally immunized hamsters presented anti-FliC antibodies in sera after immunizations. These results suggest that an oral immunization with FliC-loaded beads probably induced a mucosal immune response, therefore providing a protective effect. This study confirms the importance of FliC encapsulation into pectin beads for a protective oral vaccine against *C. difficile*.

## 1 Introduction

*Clostridium difficile* is a Gram positive, anaerobic spore forming bacterium, and is the leading cause of antibiotic-associated diarrhea. Gut microbiota dysbiosis enables *C. difficile* colonization of the intestinal tract. After contamination, *C. difficile* spores germinate, vegetative forms multiply and toxins are released, disrupting epithelium integrity and inducing inflammatory response in the colon (Koenigsnecht *et al.*, 2015). Promoting a local intestinal immunity could trigger protection against *C. difficile* infection (Péchiné and Collignon, 2016). Even if intra-rectal route showed promising results by inducing a protective immune response directed to *C. difficile* (Bruxelle *et al.*, 2016; Mizrahi *et al.*, 2014; Péchiné *et al.*, 2011), developing the oral route represents a rational choice because of increased patient acceptance and comfort. To overcome the gastrointestinal barrier, antigen encapsulation is recommended to maintain its integrity and its immunogenicity.

40 Biocompatible and biodegradable polymers are interesting materials for encapsulation. For instance,  
41 pectin, a non-toxic polysaccharide, has previously shown promising capacity for protein  
42 encapsulation and colonic delivery (Bourgeois *et al.*, 2005; Sandolo *et al.*, 2011). Indeed, pectin is  
43 not degraded by gastric or intestinal enzymes but is almost totally degraded by pectinolytic enzymes  
44 in the colon (Bourgeois *et al.*, 2005). Current strategies for vaccine development against *C. difficile*  
45 target either toxins or colonization factors. Systemic vaccines targeting toxins are currently tested in  
46 clinical trials (NCT01887912; NCT0309019; NCT02316470) and have shown efficacy on protection  
47 against *C. difficile* clinical symptoms. However, targeting colonization factors could prevent  
48 symptomatic infection and *C. difficile* colonization and therefore limit dissemination of the bacteria  
49 in the environment. Several vaccine candidates targeting colonization factors showed promising  
50 results (Bruxelle *et al.*, 2016; Mizrahi *et al.*, 2014; Sandolo *et al.*, 2011; Ghose *et al.*, 2016). Here we  
51 assess the potential of *C. difficile* flagellin FliC as a mucosal vaccine antigen. FliC is a 39 kDa  
52 structural protein of the flagellum. Highly immunogenic, flagellin harbors a unique pathogen-  
53 associated molecular pattern implicated in toll-like receptor-5 (TLR-5) recognition and a  
54 hypervariable antigenic domain. These immunological properties enable the flagellin to act as its own  
55 adjuvant and as antigen, so, FliC represents a promising vaccine candidate (Flores-Langarica *et al.*,  
56 2012; Ghose *et al.*, 2016). The aims of this study were to assess the suitability of pectin beads to  
57 deliver this protein to the colon and to evaluate FliC-loaded beads in gastro-resistant capsules, as an  
58 oral vaccine candidate against *C. difficile* in a hamster lethal-model of *C. difficile* infection.

## 59 **2 Material and methods**

### 60 **2.1 Preparation of pectin beads**

61 Recombinant FliC was obtained and purified as previously described (Batah *et al.*, 2016) with  
62 exception that the purified protein was dialyzed against TRIS buffer (25 mM, pH 7,5). Pectin beads  
63 were prepared as previously detailed (Sandolo *et al.*, 2011) with Unipectine™ OG175C (Cargill)  
64 dissolved in TRIS buffer (25 mM, pH 7,5) at the concentration of 6% (w/V). The pectin solution was  
65 then dropped into a cross-linking solution of Zn acetate (12%, w/V). Beads, formed instantaneously  
66 by contact with zinc ions, were left in the cross-linking solution for 30 minutes at room temperature  
67 under magnetic stirring. Beads were washed three times with distilled water and then dried 3 hours at  
68 37°C. To determine encapsulation efficacy, beads were disintegrated in TRIS buffer (25 mM, pH 7.5)  
69 added with EDTA (50 mM). Proteins were dosed using Bradford dye-binding method.

### 70 **2.2 Analyze of protein release from beads in simulated digestive media**

71 Analysis of FliC release was carried out in two different simulated digestive media as previously  
72 described (Sandolo *et al.*, 2011): 5 h in Simulated Intestinal Medium (SIM, HEPES/NaCl buffer, pH  
73 6.8) containing pancreatin (1% w/V) followed by 5 h in Simulated Colonic Medium (SCM,  
74 HEPES/NaCl buffer, pH 6) containing  $\geq 760$  U/mL of pectinase from *Aspergillus aculeatus* (Sigma).  
75 Presence of FliC and pectinase in the same medium makes difficult to dose proteins by Bradford dye-  
76 binding method. So, loaded beads were prepared using rhodamine-labelled FliC. Labeling and  
77 release protocol were performed as previously described (Sandolo *et al.*, 2011), and the amount of  
78 FliC released was determined by spectrofluorometry in duplicate.

### 79 **2.3 Gastro-resistant coating of capsule containing beads for oral immunization**

80 To protect beads from the harsh gastric acid environment, they were placed into gelatin capsules (size  
81 9, Harvard Apparatus) coated with a hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP 50) film.  
82 Coating was performed by dipping capsules into a 10% (w/V) solution of HPMCP 50 in

83 acetone/ethanol (1:1 v:v) and drying them at room temperature. This process was repeated six times.  
84 The efficacy of the gastro-resistant coating was checked by a disintegration test according to  
85 European pharmacopoeia (capsules undamaged after 2 h in HCl 0.1 M).

## 86 **2.4 Animals**

87 The vaccination study was carried out in a model of infection using *Mesocricetus auratus* female  
88 hamsters (weight, 80–100 g, Janvier Laboratories). Animals were housed individually in a sterile  
89 environment. Protocols involving animals and their care were conducted in conformity with the  
90 institutional guidelines that are in compliance with national and international laws and policies. The  
91 protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments University of Paris-  
92 Sud and the French Minister of Research. All efforts were made to minimize animal suffering.

## 93 **2.5 Vaccination protocol**

94 Five groups of 6 animals were used. Each vaccinated animals received a total of 300 µg of FliC in  
95 three administrations of 100 µg of FliC every fifteen days. One group was immunized with FliC-  
96 loaded beads given orally and a control group received unloaded beads orally. Three other groups  
97 were immunized with recombinant FliC by oral, intra-rectal or intra-peritoneal route. All groups  
98 received a total of three doses of vaccine on days 0, 15 and 30. Before challenge, hamsters received  
99 by gavage clindamycin at a single dose of 50 mg/kg and gentamicin twice a day during 5 days at a  
100 dose of 2.5 mg/kg to disrupt the microbiota barrier. Then, hamsters were orally challenged by  $5.10^4$   
101 spores of *C. difficile* strain VPI 10463 (Figure 1).

## 102 **2.6 Evaluation of specific antibody level in sera after immunization**

103 To evaluate the antibody response in sera, blood samples were withdrawn before the first  
104 immunization and 15 days after the last immunization, before *C. difficile* challenge. Indirect ELISA  
105 was used to detect antibodies in the sera as described before (Péchiné *et al.*, 2011). Wells of 96-well  
106 microtitre plates (MaxiSorp, Nunc) were coated with 100 µL of a 5 µg/mL solution of recombinant  
107 purified FliC. Sera were tested in duplicated at dilution 1:500 in 100 µL final volume. After five  
108 washings with phosphate buffer (PBS) and Tween-20 (0.1%), an aliquot of 100 µL per well of a  
109 rabbit anti-hamster immunoglobulins conjugated to biotin (1:8000 dilution; Biovalley) was added  
110 and plates were incubated for 30 min at 37°C. Then, after five washings, 100 µL per well of  
111 streptavidin–HRP (1:10000 dilution; ThermoScientific) were added and plates were incubated for 30  
112 min at 37°C. Assays with antigen in the absence of sera served as negative controls. Immunoglobulin  
113 levels are expressed as OD units.

## 114 **2.7 Statistical analysis**

115 Animal surviving rate was analyzed using Kaplan–Meier estimates. Survival rates across groups  
116 were compared using log rank test, p-values < 0.05 were considered as statistically significant.  
117 Mann-Withney U-test was performed to analyzed specific anti-FliC antibody levels in sera after  
118 immunizations, p-values < 0.05 were considered as statistically significant.

119

## 120 3 Results

### 121 3.1 Flagellin encapsulation in pectin beads and *in vitro* release

122 Here we encapsulated a 39 kDa protein, the *C. difficile* flagellin FliC, into pectin beads for oral  
123 vaccination. About 40 to 45 beads were obtained per milliliter of pectin solution. After drying, beads  
124 had an ellipsoid shape with a 1.2-1.5 mm diameter and weighed between 1.5 and 2 mg (Figure 2).  
125 FliC was entrapped with an efficacy of about  $30 \pm 10\%$  (n=5) corresponding to  $3 \pm 1 \mu\text{g}$  of FliC by  
126 pectin bead. In vitro characterization confirms beads stability in SIM and protein release in SCM  
127 containing pectinase. Less than 10% of FliC was released after 5 h of incubation in SIM and dried  
128 beads swelled keeping their shape. After being placed in SCM, beads started to disintegrate leading  
129 to the release of FliC. Between 2 and 3 h were sufficient to release more than 80% of entrapped FliC  
130 (Figure 3).

### 131 3.2 Vaccination with flagellin against *C. difficile* infection in hamster model

132 We showed here that encapsulation of FliC into pectin beads for oral administration significantly  
133 protected hamster against *C. difficile* lethal challenge (Figure 4). Indeed at day 17 after challenge,  
134 50% of hamsters survived in the group orally vaccinated with FliC-loaded beads whereas no survival  
135 was observed with free FliC (p-value=0.041) and only 17% survival in the control group (p-  
136 value=0.13). Surprisingly, only 17% of hamsters survived in the intra-rectally vaccinated group and  
137 33% in the intra-peritoneally vaccinated group.

### 138 3.3 Antibody response induced after vaccination

139 To correlate the observed protection with the systemic immune response induced by vaccination, we  
140 evaluated the specific antibody response against FliC in sera. We observed only an increased level of  
141 FliC-specific polyclonal antibodies in sera of intra-peritoneally immunized hamsters (Figure 5).

## 142 4 Discussion

143 One of the vaccine strategies against *C. difficile*, is to target surface proteins involved in intestinal  
144 colonization. The flagellin FliC is a promising vaccine candidate, indeed, Ghose *et al.* reported that  
145 intra-peritoneal immunization with FliC and alum led to 43 to 64% of protection in a hamsters model  
146 and 40 to 100% protection in mice model in a dose dependent manner (Ghose *et al.*, 2016). In our  
147 assay, intra-peritoneal immunization of hamsters with FliC led to 33% of protection against *C.*  
148 *difficile*, this lower protection compared to Ghose *et al* assay is probably due to the difference of  
149 virulence between VPI 10463 *C. difficile* strain used here and the 630 $\Delta$ erm strain used in Ghose *et al*  
150 study (Theriot *et al.*, 2016). Of note here, we demonstrated that the high immunogenicity of FliC  
151 enables to induce a strong systemic antibody response after intra-peritoneal immunization without  
152 supplementary adjuvant.

153 Most importantly, here we obtained a better protection than intra-peritoneal immunization by  
154 developing an oral vaccine with FliC encapsulated into pectin beads to target colonic release. We  
155 showed that this strategy can significantly protect 50% of hamster from CDI. Ghose *et al.*  
156 demonstrated that the protection induced by FliC immunization was antibody-mediated. As immune  
157 response results showed, the partial protection observed against *C. difficile* did not seem to be  
158 correlated to a systemic antibody response. Here, after oral vaccination with FliC as antigen when  
159 encapsulated into pectin beads, no specific antibody response was detected in sera. This was  
160 previously observed in another assay of oral vaccination of hamster with Cwp84 encapsulated in

161 pectin beads. Although vaccinated hamsters were partially protected (40%) against CDI, they did not  
162 develop a systemic antibody response specific to the antigen (Sandolo *et al.*, 2011). This suggests  
163 other mechanisms of protection such as the induction of a local IgA response. It has been previously  
164 shown in a mouse model that systemic immunization with flagellin can activate mucosal dendritic  
165 cells and induce an isotype switch to IgA (Flores-Langarica *et al.*, 2012). Unfortunately reagents are  
166 not commercially available to measure specific IgA response in hamster. However, we can  
167 hypothesize that FliC oral administration induces a protective mucosal IgA response rather than a  
168 systemic IgG immune response.

169 *C. difficile* is a non-invasive enteropathogen, the induction of a mucosal immune response close to  
170 the site of infection appears to be the best choice. For vaccine development against non-invasive  
171 gastrointestinal infections such as enterotoxigenic *Vibrio cholerae* or *Escherichia coli*, the protection  
172 is conferred mainly by specific IgAs and by the induction of a memory immune response (Holmgren  
173 and Czerkinsky, 2005). A vaccine strategy, which aims to prevent alteration of the intestinal  
174 epithelium by targeting the early stages of the infectious *C. difficile* process, should ideally allow the  
175 induction of an IgA response to the intestinal lumen in addition of a systemic antibody response.  
176 Therefore, the development of a mucosal vaccine against *C. difficile* could benefit of further  
177 attention.

178 Moreover in this study, the weak protection observed by intra-rectal administration of FliC compared  
179 to the oral administration of FliC-loaded beads and the absence of protection within the orally treated  
180 group with free FliC, attests the importance of the administration route and the use of pectin as a  
181 delivery system for FliC.

182 To conclude, we showed that oral vaccination with *C. difficile* flagellin FliC encapsulated into pectin  
183 beads is protective against a virulent strain of *C. difficile* in a hamster model. This study attests the  
184 importance of the adequacy between the administration route, the delivery system and the vaccine  
185 candidate in the design of a mucosal protective immunization strategy for human use against *C.*  
186 *difficile*.

## 187 **5 Author Contributions**

188 JFB performed the experiment, analyzed the data and drafted the manuscript. SP and NT conceived  
189 and designed the study, discussed the results and critically revised the manuscript. SH participated in  
190 the animal experiments. EF conceived and designed the experiments, discussed the results and  
191 revised the manuscript. AC and CJ participated in project planning and manuscript revision. All  
192 authors read and approved the final manuscript.

## 193 **6 Acknowledgment**

194 This work was supported by the technical assistance of Valerie Dupont-Domergue and staff from the  
195 animal care facility of IPSIT.

## 196 **7 Conflict of interest statement**

197 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
198 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 199 **8 References**

- 200 Batah, J., Denève-Larrazet, C., Jolivot, P.-A., Kuehne, S., Collignon, A., Marvaud, J.-C., *et al.*  
 201 (2016). *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in  
 202 epithelial cells. *Anaerobe* 38, 116–124. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.01.002.
- 203 Bourgeois, S., Laham, A., Besnard, M., Andremont, A., and Fattal, E. (2005). In vitro and in vivo  
 204 evaluation of pectin beads for the colon delivery of beta-lactamases. *J. Drug Target.* 13, 277–  
 205 284. doi:10.1080/10611860500206583.
- 206 Bruxelle, J.-F., Mizrahi, A., Hoys, S., Collignon, A., Janoir, C., and Péchiné, S. (2016).  
 207 Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and  
 208 vaccination assays in animal models. *Anaerobe* 37, 78–84.  
 209 doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.010.
- 210 Flores-Langarica, A., Marshall, J. L., Hitchcock, J., Cook, C., Jobanputra, J., Bobat, S., *et al.* (2012).  
 211 Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives  
 212 Foxp3+ regulatory T cell and IgA responses in the mesenteric lymph node. *J. Immunol.*  
 213 *Baltim. Md* 1950 189, 5745–5754. doi:10.4049/jimmunol.1202283.
- 214 Ghose, C., Eugenis, I., Sun, X., Edwards, A. N., McBride, S. M., Pride, D. T., *et al.* (2016).  
 215 Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein  
 216 FliC. *Emerg. Microbes Infect.* 5, e8. doi:10.1038/emi.2016.8.
- 217 Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 11, S45-53.  
 218 doi:10.1038/nm1213.
- 219 Koenigsnecht, M. J., Theriot, C. M., Bergin, I. L., Schumacher, C. A., Schloss, P. D., and Young,  
 220 V. B. (2015). Dynamics and Establishment of *Clostridium difficile* Infection in the Murine  
 221 Gastrointestinal Tract. *Infect. Immun.* 83, 934–941. doi:10.1128/IAI.02768-14.
- 222 Mizrahi, A., Collignon, A., and Péchiné, S. (2014). Passive and active immunization strategies  
 223 against *Clostridium difficile* infections: state of the art. *Anaerobe* 30, 210–219.  
 224 doi:10.1016/j.anaerobe.2014.07.006.
- 225 Péchiné, S., and Collignon, A. (2016). Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Anaerobe*  
 226 41, 68–78. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.04.014.
- 227 Péchiné, S., Denève, C., Le Monnier, A., Hoys, S., Janoir, C., and Collignon, A. (2011).  
 228 Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as  
 229 an antigen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63, 73–81. doi:10.1111/j.1574-  
 230 695X.2011.00832.x.
- 231 Sandolo, C., Péchiné, S., Le Monnier, A., Hoys, S., Janoir, C., Coviello, T., *et al.* (2011).  
 232 Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*.  
 233 *Eur J Pharm Biopharm* 79, 566–573. doi:10.1016/j.ejpb.2011.05.011.
- 234 Theriot, C. M., Bowman, A. A., and Young, V. B. (2016). Antibiotic-Induced Alterations of the Gut  
 235 Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore  
 236 Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere* 1. doi:10.1128/mSphere.00045-  
 237 15.

238 **Figure 1.** Vaccination protocol.

239 **Figure 2.** Dried pectin beads (scale bar represents 1 cm).

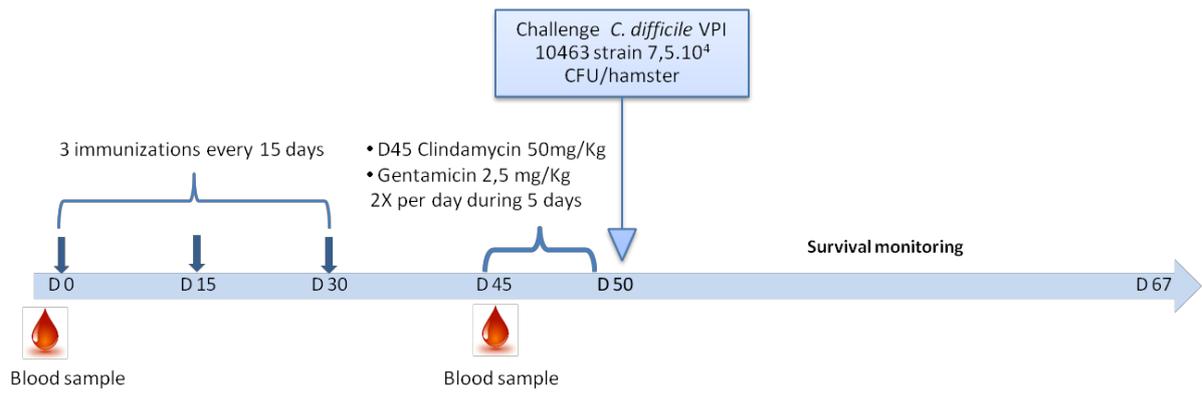
240 **Figure 3.** In vitro FliC release from pectin beads in Simulated Intestinal Medium (SIM) for 5h and  
241 Simulated Colonic Medium (SCM) for other 5h (n=2).

242 **Figure 4.** Survival monitoring of hamsters after challenging with spores of *C. difficile* VPI 10463  
243 strain. \* p-value < 0.05

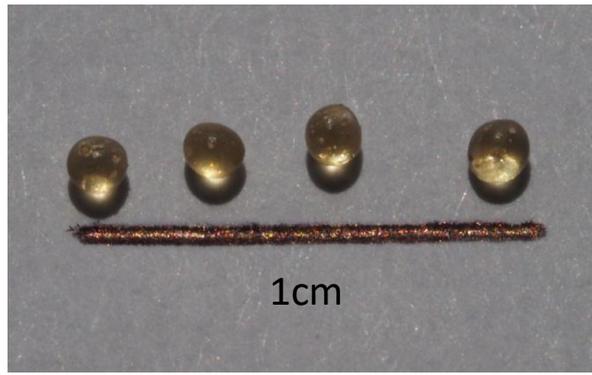
244 **Figure 5.** Detection of specific anti-FliC antibodies in hamster sera before (D0) and after vaccination  
245 (D45). \* p-value < 0.05

246

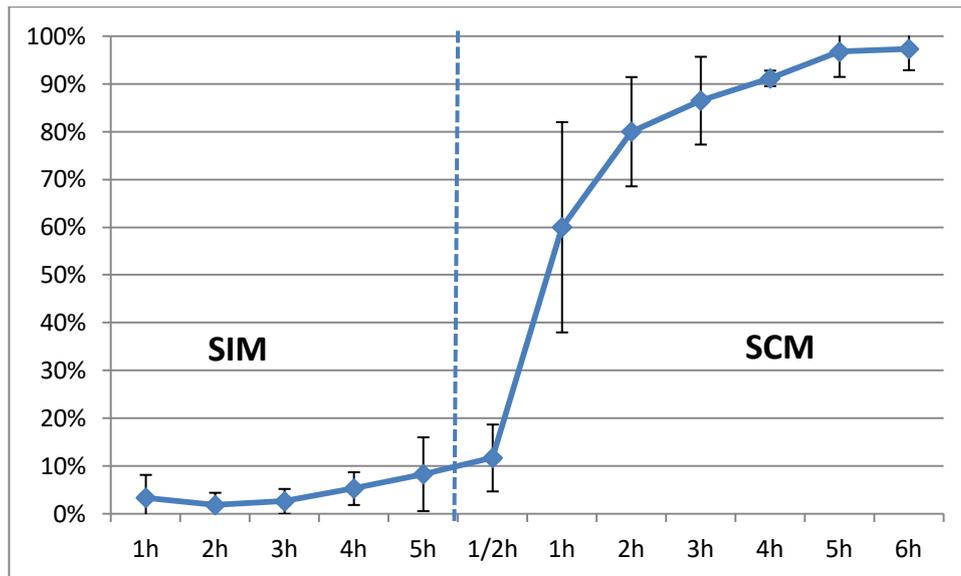




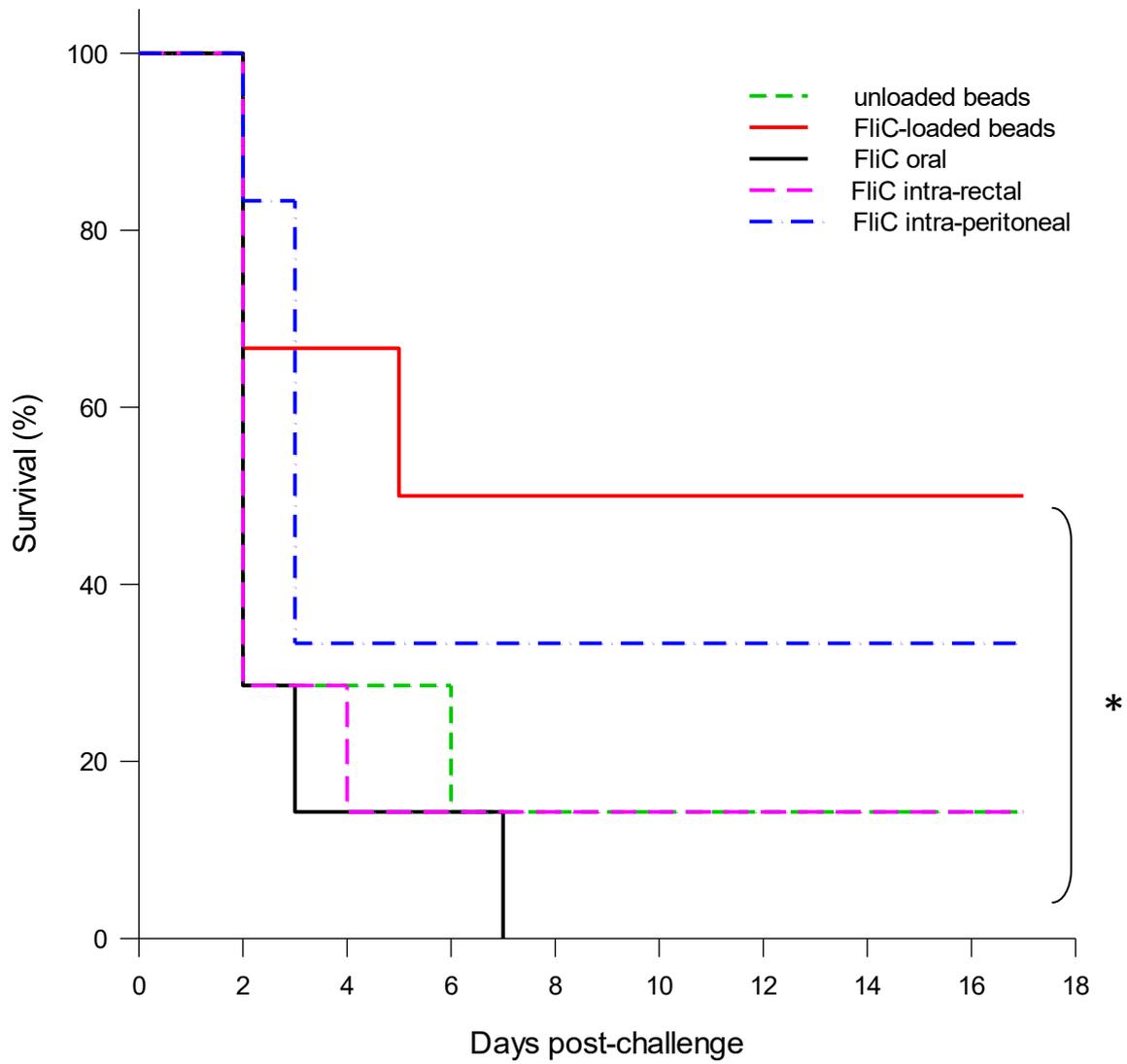
**Fig.1** Vaccination protocol.



**Fig.2** Dried pectin beads (scale bar represents 1 cm).

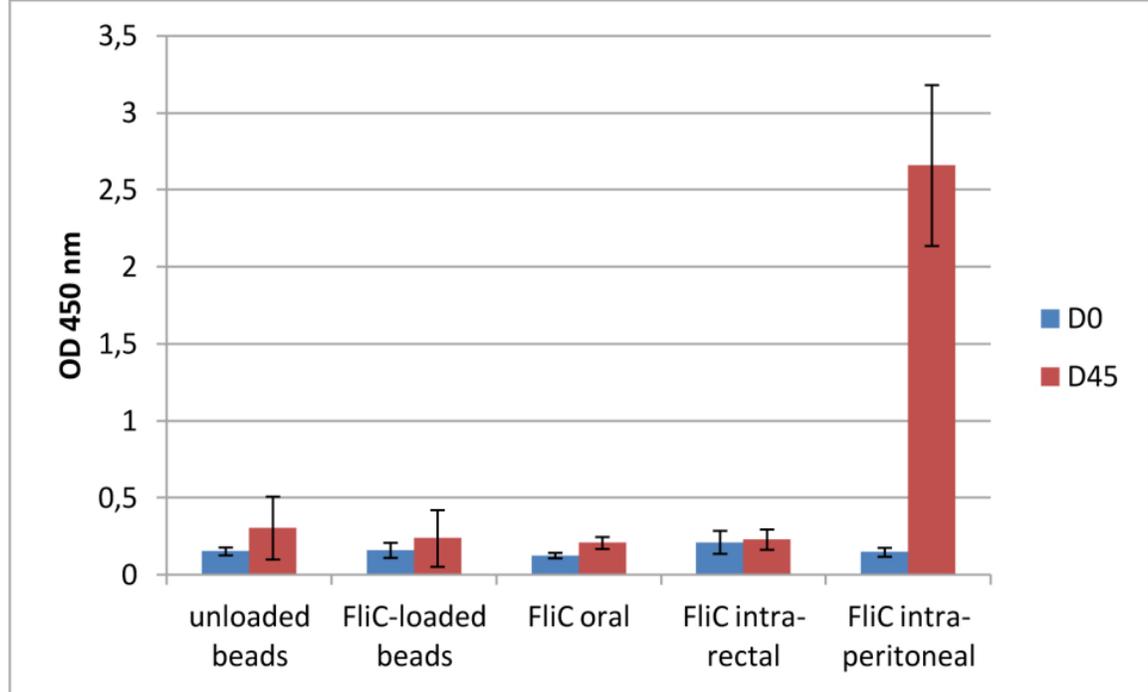


**Fig.3** In vitro FliC release from pectin beads in Simulated Intestinal Medium (SIM) for 5h and Simulated Colonic Medium (SCM) for other 5h (n=2).



**Fig.4** Survival monitoring of hamsters after challenging with spores of *C. difficile* VPI 10463

strain. \* p-value < 0.05



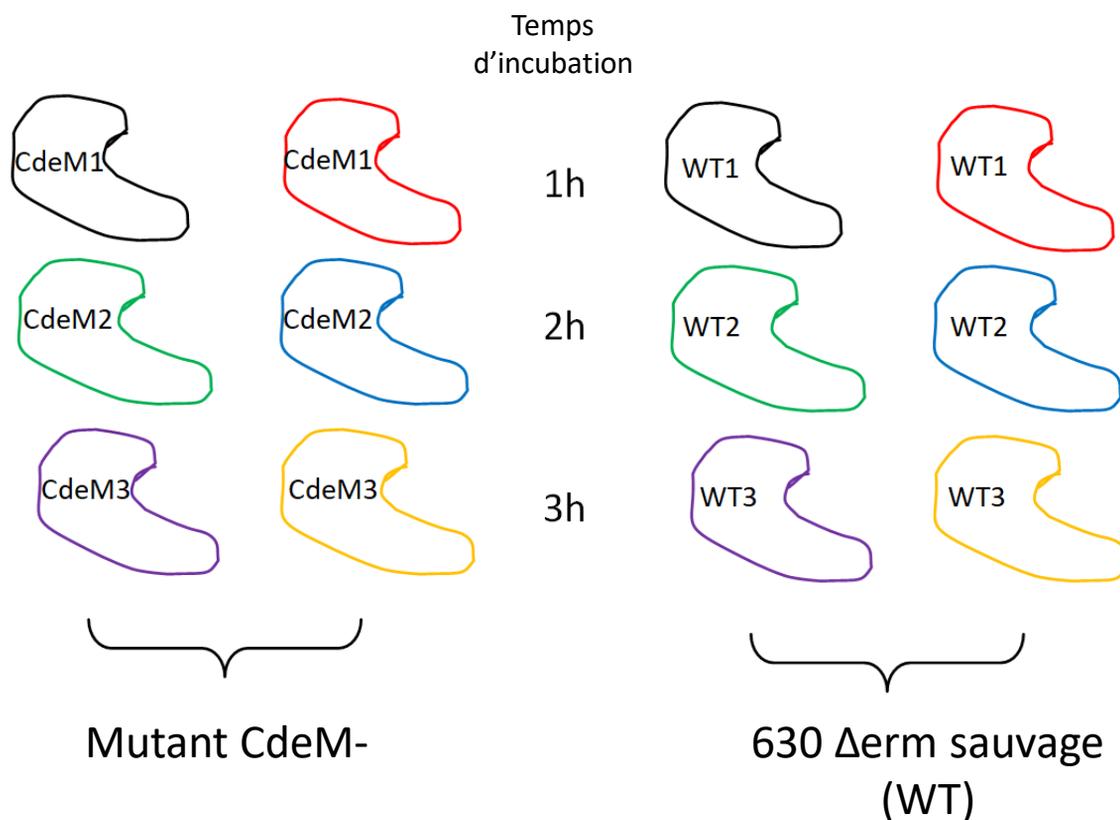
**Fig.5** Detection of specific anti-FliC antibodies in hamster sera before (D0) and after vaccination (D45). \* p-value < 0.05

### 3. Recherche de nouveaux candidats vaccins

Les essais de vaccination par voie muqueuse ciblant un facteur de colonisation unique tels que la protéase Cwp84 (Péchiné *et al.* 2011; Sandolo *et al.* 2011), la protéine GroEL (Péchiné *et al.* 2013), le précurseur SlpA (Bruxelle *et al.* 2016) ou la flagelline FliC, ont induit des protections partielles contre les infections à *C. difficile* dans les modèles hamsters et souris. La colonisation par *C. difficile* est un processus multifactoriel, l'identification de nouvelles cibles vaccinales permettrait de compléter le nombre de candidats vaccins prometteurs et d'améliorer le développement d'une stratégie vaccinale. Par ailleurs, les essais d'immunisation par voie intra-rectale ciblant plusieurs facteurs de colonisation ont montré des résultats prometteurs et l'intérêt de cibler plusieurs antigènes (Péchiné *et al.* 2007). Par exemple, la combinaison de facteurs de colonisation et de facteurs de virulence permettrait de cibler les différentes étapes de la physiopathologie des ICD et d'induire une protection complète.

Dans les deux études suivantes, nous nous sommes intéressés à deux nouvelles cibles vaccinales la protéine sporale CdeM et la lipoprotéine CD0873 potentiellement impliquées dans la virulence et le processus de colonisation de *C. difficile*. Ces deux essais ont été réalisés en collaboration avec des équipes internationales portugaise et britannique.

Enfin, nous avons réalisé un essai d'immunisation par voie intra-rectale afin d'apporter une preuve de concept d'une stratégie vaccinale combinant des facteurs de colonisation et une toxine par administration par voie muqueuse.



**Figure 21.** Protocole d'adhésion à la muqueuse caecale de hamster *ex vivo*, des spores de la souche mutante CdeM- et de la souche sauvage 630  $\Delta$ erm (WT). Les couleurs des sections de caecums représentent des hamsters différents.

### 3.1. Rôle de CdeM dans la virulence de *C. difficile*

#### Introduction et objectif.

La protéine CdeM est exposée à la surface de la spore de *C. difficile* et contribue à la formation de l'exosporium. L'exosporium est la couche la plus externe de la spore, et participerait à l'adhésion des spores aux cellules épithéliales ainsi qu'à l'échappement au système immunitaire (Paredes-Sabja *et al.* 2014). Cependant, le rôle de CdeM dans la physiopathologie des ICD mérite d'être approfondi.

L'objectif de cette étude était dans un premier temps d'évaluer le rôle de CdeM dans la virulence de *C. difficile* dans un modèle hamster. Puis dans un deuxième temps, nous avons déterminé le rôle de CdeM dans l'adhésion de la spore à la muqueuse intestinale du hamster dans un modèle *ex vivo*. Cette étude a été réalisée en collaboration avec B. Dupuy, Institut Pasteur de Paris et A. Henriques, « Institute for chemical and biological technology (ITQB) », Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

#### Matériel et méthodes.

Dans un premier temps, le rôle de CdeM dans la virulence de *C. difficile* a été étudié *in vivo* dans un modèle hamster.

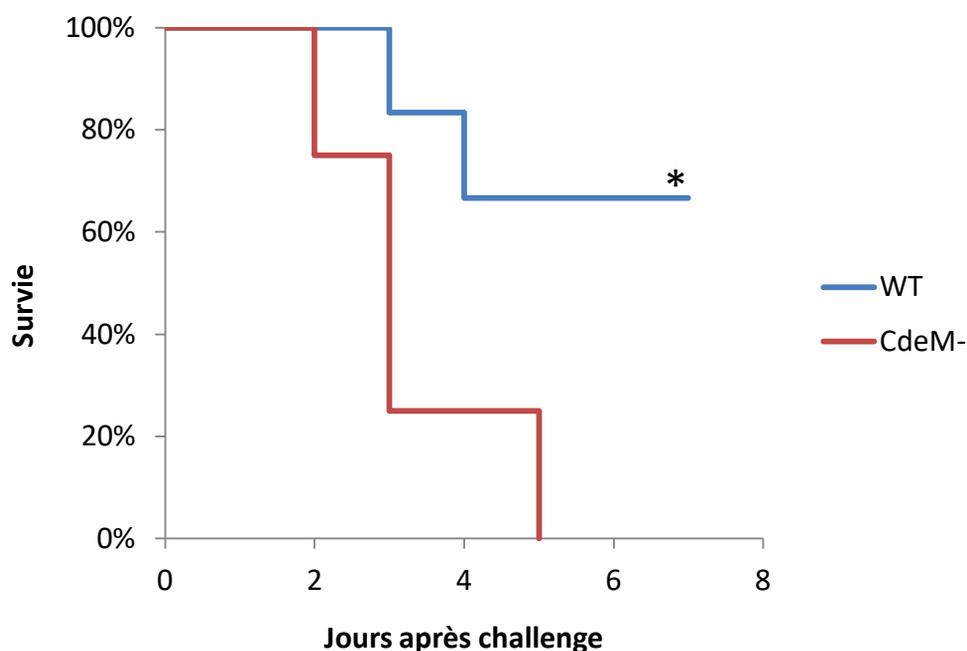
Quatorze hamsters femelles (*Mesocricetus auratus* âgées de 6 semaines) ont été infectées. Après traitement antibiotique à la clindamycine (50 mg/kg) pour altérer le microbiote intestinal, six hamsters ont été infectés par des spores de la souche sauvage toxigène 630 $\Delta$ erm (WT) de *C. difficile* ( $10^4$  UFC/ml), et huit hamsters ont été infectés par la même quantité de spores de la souche mutante 630 $\Delta$ erm cdeM::CT (CdeM-). Par la suite, les signes cliniques et la survie des animaux ont été suivis deux fois par jour. L'infection des hamsters a été confirmée après détection de *C. difficile* dans les fèces par culture.

La survie des hamsters post-challenge a été analysée par le test statistique de Kaplan Meier.

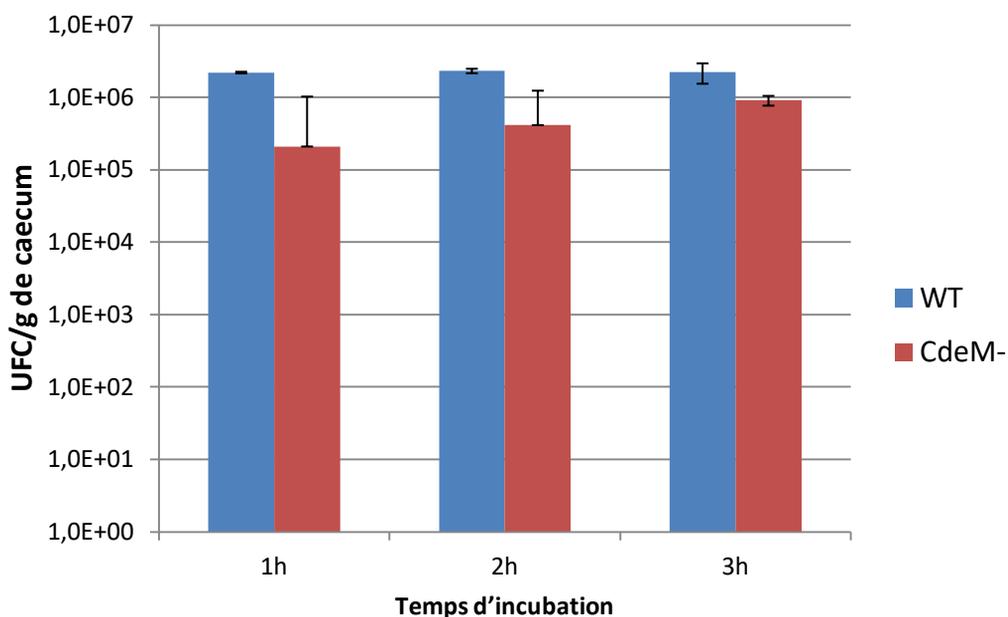
Dans un deuxième temps, l'étude d'adhésion *ex vivo* a été réalisée à partir de 6 caecums prélevés chez des hamsters non infectés. Chaque caecum a été retourné et lavé huit fois dans du PBS puis coupé en deux longitudinalement. Les 12 sections de caecum ont été réparties en six groupes de 2 sections issues de caeca différents (Figure 21). Les sections de caecum ont été inoculées soit avec une suspension de spore de la souche sauvage 630 $\Delta$ erm ( $10^6$



a. **Taux de survie des hamsters après challenge**



b. **Adhésion des spores de *C. difficile* au caecum *ex vivo***



**Figure 22.** Rôle de CdeM dans la virulence et l'adhésion de *C. difficile* a. Suivi de la survie après challenge \*: p<0.05 (Kaplan Meier) b. Taux de spores de *C. difficile* associées aux caeca après 1, 2, 3h d'incubation *ex vivo*

UFC/ml) soit une suspension de spore de la souche mutante CdeM- ( $10^6$  UFC/ml). Après incubation sous agitation douce en aérobie à température ambiante de 1h, 2h, ou 3h, les sections de caecum ont été lavées quatre fois et pesées. Puis les sections ont été diluées dans du PBS et broyées 1 minute à l'UltraTurax<sup>TM</sup> afin d'obtenir une suspension à 10 mg/ml. La quantité de spores adhérentes au caecum a été déterminée par dilutions successives des broyats et mise en culture d'un aliquot de 100  $\mu$ l sur gélose au sang avec taurocholate (0.1%). Les résultats ont été exprimés en UFC/g de caecum.

### **Résultats.**

Dans un premier temps, l'essai de virulence a montré une mortalité accrue significative dans le groupe de hamsters infectés avec la souche mutante CdeM- comparativement au groupe infecté avec la souche sauvage (WT) de *C. difficile* ( $p < 0.011$ ). Tous les hamsters (8/8) infectés par le mutant CdeM- sont morts en 5 jours alors que 66% (4/6) des hamsters infectés par la souche WT ont survécu jusqu'à la fin de l'essai (7 jours après challenge) (Figure 22 a).

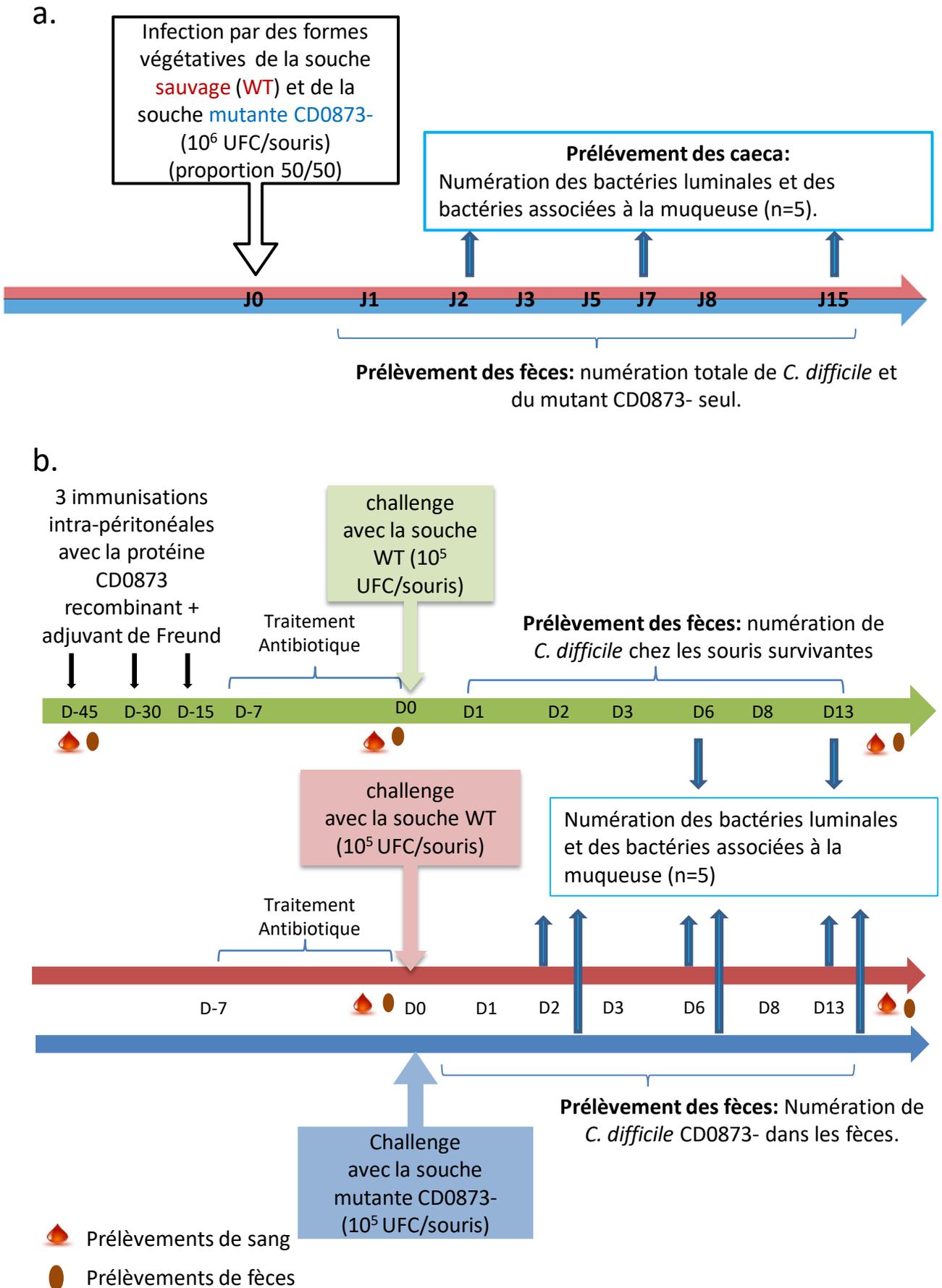
Dans un deuxième temps, l'essai d'adhésion ex vivo a montré une adhésion plus faible au tissu caecal de hamster pour les spores de la souche mutante CdeM- comparativement à la souche WT après 1h, 2h ou 3h d'incubation (Figure 22 b).

### **Discussion et conclusion.**

Lors d'études préliminaires qui sont encore à confirmer, le mutant CdeM- a montré, en comparaison avec à la souche WT, une modification de la morphologie des spores, une germination plus rapide ainsi qu'une diminution de la colonisation dans un modèle de souris monoxénique. Ces résultats préliminaires suggèrent que la protéine CdeM pourrait jouer un rôle dans la colonisation intestinale par *C. difficile* et par conséquent dans l'établissement de l'ICD. Par ailleurs, Ghose *et al.* ont montré, dans un essai de vaccination par voie intrapéritonéale avec la protéine CdeM co-administrée avec de l'alun, une importante protection contre *C. difficile* chez la souris (100%) et le hamster (87%) (Ghose *et al.* 2016a), démontrant ainsi l'intérêt de cibler l'exosporium de la spore de *C. difficile* dans une stratégie vaccinale.

Dans cette étude, nous avons observé dans un modèle hamster une virulence accrue après une infection des animaux avec le mutant CdeM- comparé à la souche sauvage. Cette virulence augmentée pourrait être expliquée par l'augmentation de la vitesse de germination du mutant

par rapport à la souche sauvage et par la grande sensibilité des hamsters pour *C. difficile*. On peut supposer que CdeM pourrait jouer un rôle dans le processus de colonisation intestinale de *C. difficile* par sa participation dans l'adhésion des spores au tissu épithélial. L'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt de CdeM comme antigène vaccinal. La protéine CdeM mériterait d'être testée dans une stratégie d'immunisation par voie muqueuse ciblant la colonisation par *C. difficile*.



**Figure 23.** Protocoles d'études du rôle de la lipoprotéine CD0873 dans la colonisation intestinale. **a.** Modèle de compétition en souris dixéniques. **b.** Modèle de colonisation en souris conventionnelles.

### 3.2. Rôle de la lipoprotéine CD0873 dans la colonisation intestinale par *C. difficile*

#### Introduction et objectif.

Exposée à la surface de *C. difficile*, la lipoprotéine CD0873 a récemment été décrite comme une adhésine lors d'une étude *in vitro* dans un modèle de liaison aux cellules Caco2. Un mutant CD0873 a été construit et les formes végétatives ont montré une plus faible adhésion aux cellules Caco2 en comparaison à la souche sauvage. Cette adhésion a pu être inhibée par des anticorps anti-CD0873. De plus, il a été démontré que la protéine CD0873 purifiée pouvait s'associer aux cellules Caco2 (Kovacs-Simon *et al.* 2014). Par ailleurs, il a été montré que la protéine CD0873 était immunogène chez trois patients infectés par *C. difficile* sur six testés (Wright *et al.* 2008). Cependant, dans cette étude aucune information sur la sévérité de l'infection chez ces patients n'était disponible et la réponse de type anticorps anti-CD0873 n'a ainsi pas été corrélée à une évolution favorable de l'infection. Le rôle de la lipoprotéine CD0873 dans l'adhésion aux cellules épithéliales démontre son implication dans la colonisation intestinale. L'inhibition de cette adhésion par des anticorps spécifiques anti-CD0873 suggère la possibilité d'utiliser CD0873 comme antigène dans une stratégie vaccinale contre *C. difficile*.

L'objectif de cette étude était dans un premier temps de confirmer le rôle de la lipoprotéine CD0873 dans le processus de colonisation intestinale par *C. difficile in vivo* dans des modèles de souris dixéniques et conventionnelles. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'efficacité d'une immunisation par voie intra-péritonéale avec la protéine CD0873 co-administrée avec l'adjuvant de Freund dans un modèle souris conventionnelle. Cette étude a été réalisée en collaboration avec S. Michell, « College of Life and Environmental Science », Université d'Exeter, Royaume-Uni.

#### Matériels et méthodes.

L'étude du rôle de la lipoprotéine CD0873 dans la colonisation intestinale par *C. difficile* a été réalisée dans deux modèles souris différents, un modèle de compétition en souris dixéniques et un modèle de colonisation en souris conventionnelles (Figure 23).

Suivi de la colonisation dans un modèle de compétition en souris dixénique. Vingt souris axéniques ont été infectées à la fois, par des formes végétatives, de la souche mutante

630 $\Delta$ erm CD0873::erm ( $5.10^5$  UFC/souris) et de la souche sauvage 630 $\Delta$ erm (WT) ( $5.10^5$  UFC/souris). La suspension de gavage a été préparée à partir de deux cultures de 18h, les formes végétatives ont été comptées par microscopie sur cellule de Malassez. La capacité d'implantation et de développement (« fitness ») du mutant CD0873- a été comparée à celle de la souche WT par numération de chacune des populations bactériennes à partir des fèces tout le long de l'essai.

A J2, J7 et J15 après challenge, cinq souris par groupe ont été sacrifiées afin de numérer les bactéries adhérentes au caecum et les bactéries luminales. Le caecum a été prélevé, lavé (3 fois) et pesé, la quantité de bactéries adhérentes a été déterminée par dilutions successives des broyats et mise en culture sur gélose d'un aliquot de 100  $\mu$ l. Les bactéries luminales ont été numérées à partir du contenu caecal. Le seuil limite de détection de *C. difficile* par cette technique était de  $10^2$  UFC/g (Figure 23 a.).

Les formes végétatives de *C. difficile* ont été numérées, le mutant était sélectionné sur gélose au sang avec érythromycine (4  $\mu$ g/mL) et la population totale (mutant et sauvage) de *C. difficile* sur gélose au sang.

Suivi de la colonisation dans un modèle de souris conventionnelles. Trois groupes de 15 souris conventionnelles femelles ont été utilisés : un groupe immunisé avec la protéine CD0873 infecté par la souche sauvage 630 $\Delta$ erm (WT), un groupe non immunisé infecté par la souche mutante CD0873-, et un groupe contrôle non immunisé infecté par la souche WT (Figure 23 b.).

Le groupe de souris immunisées a reçu à trois reprises, à 15 jours d'intervalle, des doses identiques de CD0873 (50  $\mu$ g/kg) et adjuvant de Freund par voie intra-péritonéale (IP). Après la dernière immunisation, pour altérer le microbiote intestinal, les souris ont reçu pendant 7 jours un cocktail antibiotique dans l'eau de boisson: kanamycine (0.4 mg/ml), gentamicine (0.035 mg/ml), colistine (0.0567 mg/ml), metronidazole (0.215 mg/ml), vancomycine (0.045 mg/ml). La concentration des antibiotiques a été calculée en fonction du poids moyen des souris et de leur consommation d'eau attendue (Chen *et al.* 2008). Puis les souris ont été infectées par des formes végétatives de la souche sauvage 630 $\Delta$ erm (WT) ( $3.10^5$  UFC/ml).

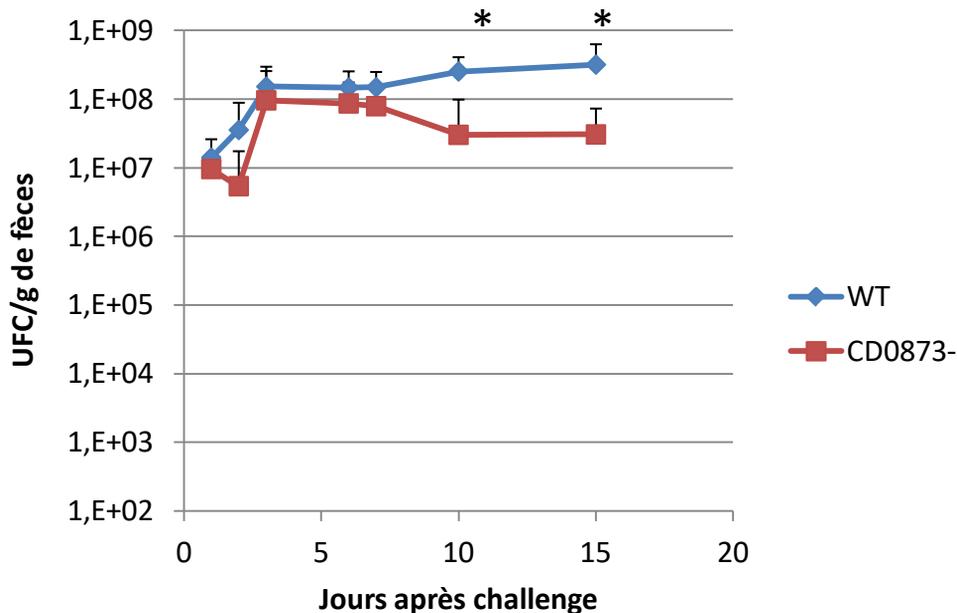
Les souris non immunisées ont reçu directement ce même traitement antibiotique. Un groupe a été infecté avec de la souche mutante CD0873- ( $1.10^5$  UFC/souris), et un groupe contrôle a été infecté avec des formes végétatives de la souche WT ( $1.10^5$  UFC/souris).

Après challenge, pour chaque groupe, la colonisation intestinale a été déterminée par numération des formes végétatives de *C. difficile* dans les fèces sur gélose au sang sélective. À J2, J6 et J13 après challenge, dans chaque groupe, cinq souris ont été sacrifiées pour numération des bactéries adhérentes au caecum et des bactéries lumineales. Le seuil limite de détection de *C. difficile* était de  $10^2$  UFC/g.

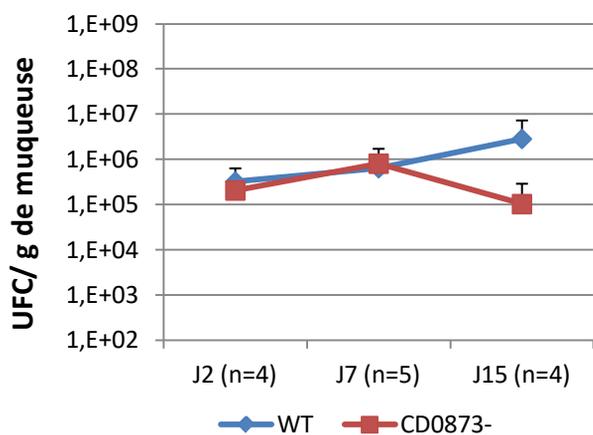
Suivi de la réponse de type anticorps spécifique de CD0873.

Avant la première immunisation et après la dernière immunisation ainsi qu'à la fin de l'essai (J13) pour les souris restantes un échantillon de sang et de fèces ont été prélevés pour chaque souris pour détecter par technique ELISA la présence d'IgG et IgA spécifiques anti-CD0873. Les résultats ont été exprimés en densité optique (DO).

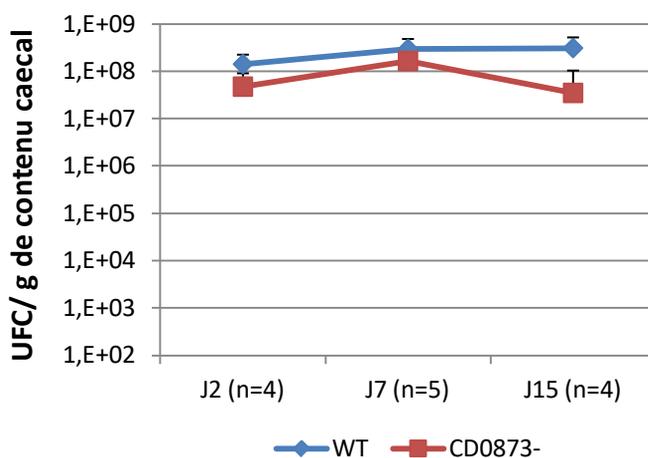
a. **Elimination de *C. difficile* dans les fèces**



b. **Bactéries associées à la muqueuse**



c. **Bactéries lumineales**



**Figure 24.** Etude du rôle de CD0873 dans la colonisation intestinale dans un modèle de compétition en souris dixénique. **a.** Suivi de l'élimination de *C. difficile* dans les fèces après challenge **b.** Taux de bactéries associées à la muqueuse **c.** Taux de bactéries lumineales.  
\*:  $p < 0.05$  (test de Mann-Whitney)

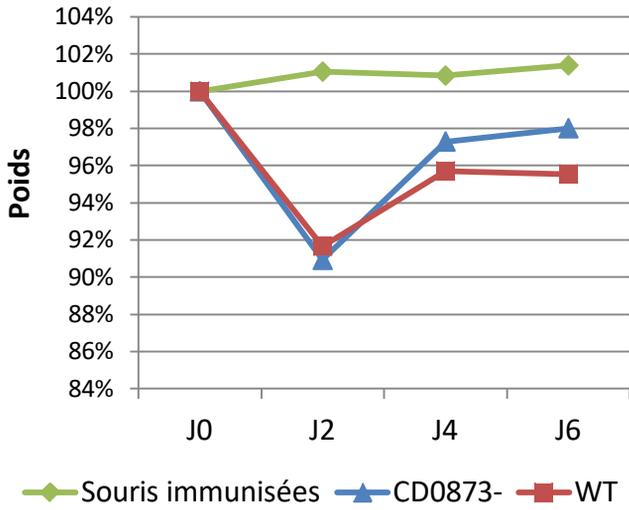


## **Résultats.**

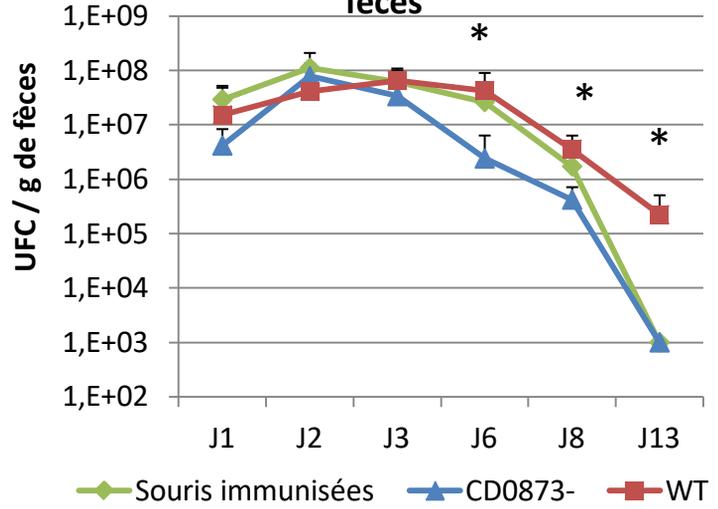
### Suivi de la colonisation dans un modèle de compétition en souris dixénique

L'étude de compétition en modèle de souris dixénique montre une diminution significative de du fitness de la souche mutante CD0873- comparée à la souche WT à partir de J10 après infection (Figure 24 a). Le nombre de bactéries mutantes CD0873- luminales et adhérentes était inférieur comparativement à la souche WT mais le nombre d'échantillons disponibles était insuffisant pour une analyse statistique (Figure 24 b et c).

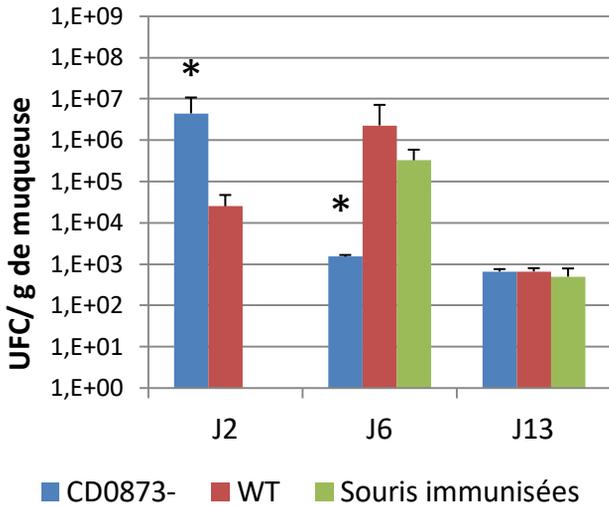
**a. Suivis de la perte de poids**



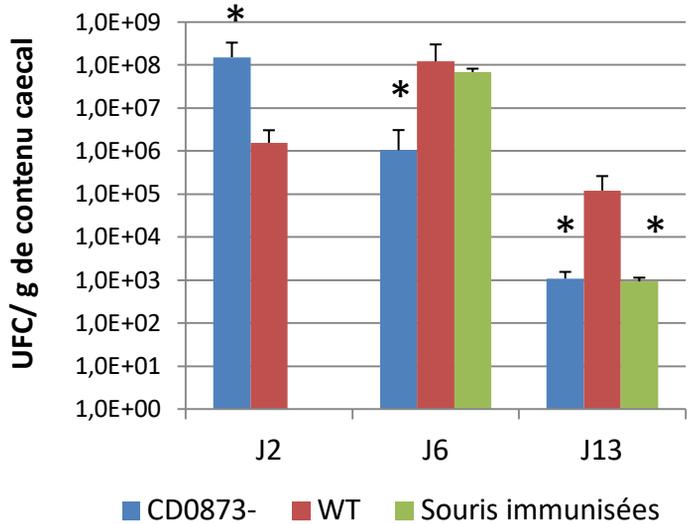
**b. Elimination de *C. difficile* dans les fèces**



**c. Bactéries associées à la muqueuse**



**d. Bactéries lumineales**



**Figure 25.** Etude du rôle de CD0873 dans la colonisation intestinale dans un modèle de colonisation en souris conventionnelle. **a.** Suivi de la perte de poids **b.** Suivi de la clairance de *C. difficile* dans les fèces après challenge **c.** Taux de bactéries associées à la muqueuse **d.** Taux de bactéries lumineales. \*: p < 0.05 (test de Mann-Whitney)

### Suivi de la colonisation dans un modèle de souris conventionnelles.

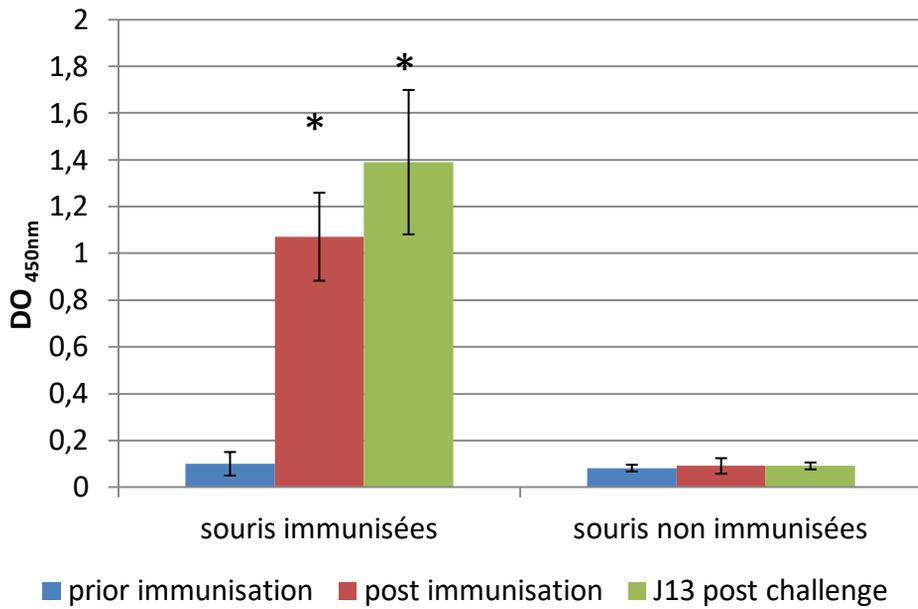
Dans le modèle de souris conventionnelles, le suivi clinique des souris a montré une absence de diarrhée ainsi qu'une absence de baisse de poids chez les souris immunisées infectées par la souche WT contrairement aux souris non immunisées infectées soit par la souche WT soit la souche mutante CD0873- (Figure 25 a).

Les souris infectées par le mutant CD0873- présentaient un taux de formes végétatives de *C. difficile* dans les fèces significativement plus faible à partir de J6 après challenge en comparaison des souris infectées par la souche WT (Figure 25 b). Ces résultats étaient associés à J6 et à J13 à une diminution du nombre de mutant CD0873- luminales et associées au caecum comparativement à la souche WT. Par ailleurs de manière surprenante, dans les temps précoces de la colonisation intestinale, à J2, la tendance était inverse, les taux de bactéries mutantes luminales et associées au caecum étaient significativement supérieurs à ceux de la souche WT (Figure 25 c et d).

Les souris immunisées par voie intra-péritonéale avec la protéine recombinante CD0873 comme antigène et l'adjuvant de Freund ont montré une diminution du taux de formes végétatives dans les fèces par rapport aux souris non immunisées, significative à J13 après challenge (Figure 25 b). À J13, ce taux était sous le seuil limite de détection pour les souris immunisées et des souris non immunisées et infectées par le mutant CD0873-. Ces résultats étaient associés à J13, à une diminution du taux de bactéries luminales par rapport au taux de bactéries luminales du groupe de souris contrôle non immunisées et infectées par la souche WT, ce taux était sous le seuil limite de détection (Figure 25 c et d).

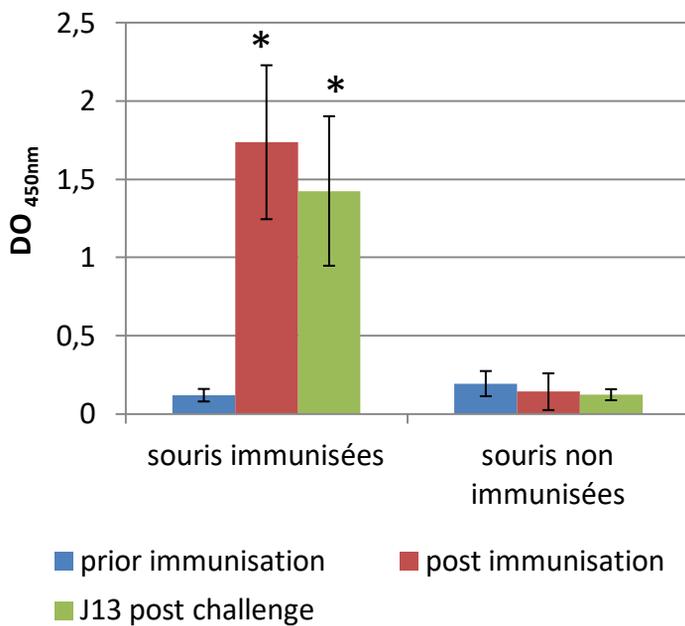
a.

## IgG sérique anti-CD0873



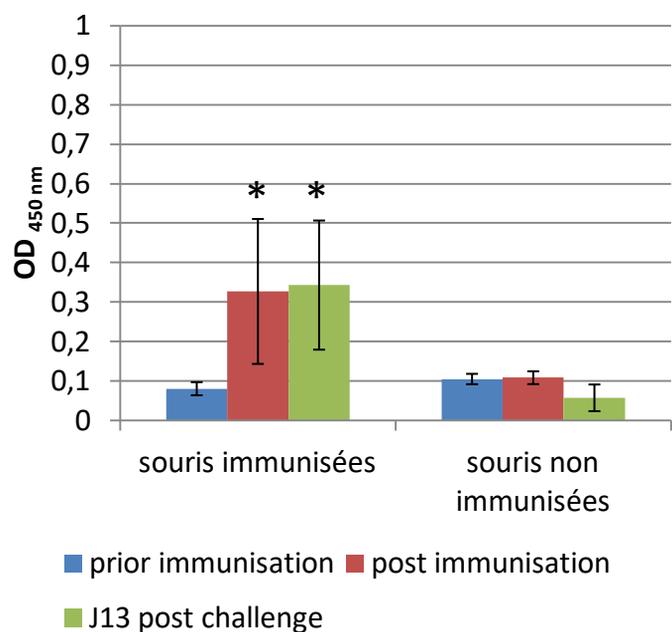
b.

## IgA anti-CD0873 dans les fèces



c.

## IgG anti-CD0873 dans les fèces



**Figure 26.** Analyse par ELISA de la réponse anticorps anti-CD0873 **a.** IgG sérique anti-CD0873 **b.** IgA anti-CD0873 dans les fèces **c.** IgG anti-CD0873 dans les fèces. \*: différences statistiquement significative avant et après immunisations  $p < 0.05$  (test de Wilcoxon)

### Suivi de la réponse de type anticorps spécifique de CD0873.

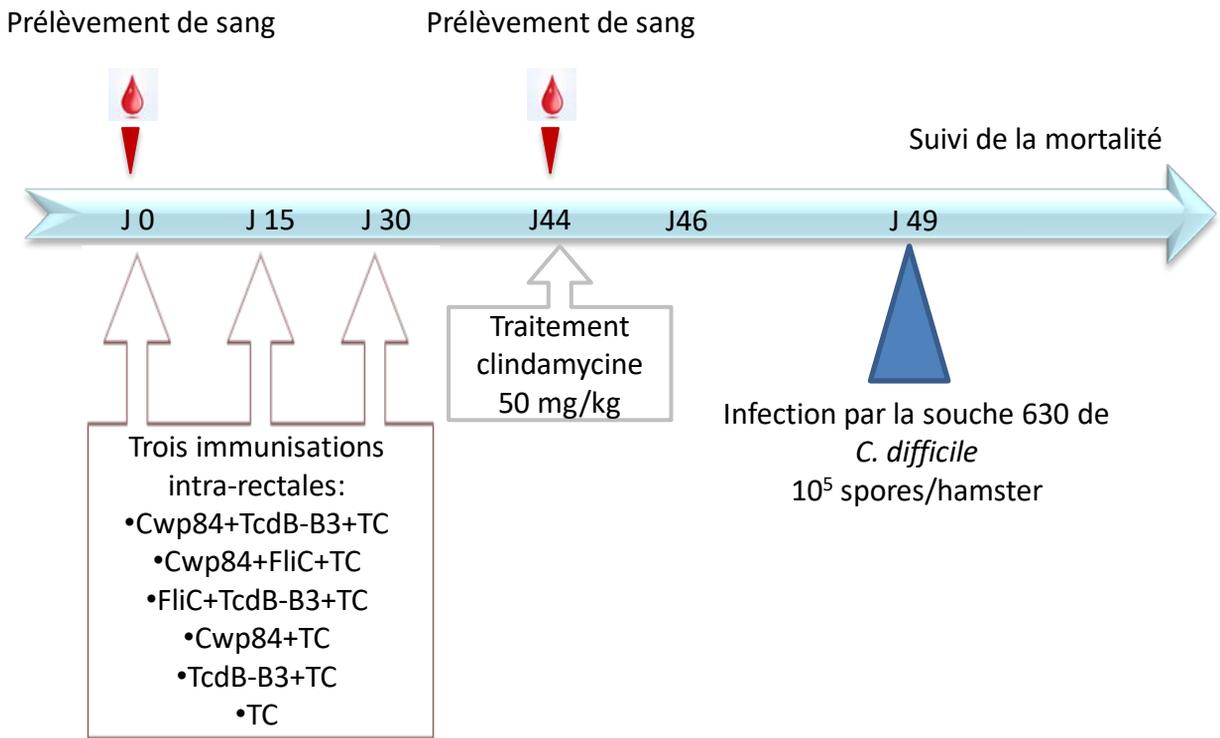
L'étude de la réponse de type anticorps induite après immunisation a révélée une production significative d'IgG sériques et d'IgG intestinales ainsi que d'IgAs anti-CD0873 contrairement aux souris non immunisées (Figure 26). À J13 après infection, nous n'avons pas observé de production d'anticorps anti-CD0873 pour les souris non immunisées et infectées soit par la souche WT soit par la souche mutante CD0873

### **Discussion et conclusion.**

De nombreuses études chez différentes bactéries pathogènes ont démontré le rôle des lipoprotéines dans l'adhésion aux tissus, ainsi que dans la colonisation de l'hôte (Kovacs-Simon *et al.* 2011). Dans cette étude nous avons décrit pour la première fois le rôle de CD0873 dans la colonisation intestinale par *C. difficile* dans deux modèles murins différents, un modèle de compétition et un modèle de colonisation. Cette lipoprotéine semble intervenir chez la souris dans les temps tardifs de la colonisation intestinale.

Par ailleurs, dans cette étude nous avons montré l'efficacité d'une immunisation par voie intra-péritonéale avec la protéine CD0873 contre la colonisation intestinale par *C. difficile* ainsi que sur la prévention des signes cliniques de l'infection chez la souris. Ces résultats étaient corrélés à la production d'IgAs et d'IgG sériques anti-CD0873 ainsi qu'à la présence d'IgG spécifiques dans les fèces.

L'ensemble de ces résultats montrent le potentiel de la protéine CD0873 dans une stratégie vaccinale ciblant la colonisation par *C. difficile*.



**Figure 27.** Protocole de vaccination par voie intra-rectale en associant plusieurs antigènes de *C. difficile* dans un modèle hamster.

### 3.3. Essai vaccinal par une combinaison d'antigènes

#### Introduction et objectif.

La physiopathologie des ICD comprend une étape de colonisation intestinale et de production de toxines. Cibler à la fois le processus de colonisation et l'action des toxines pourrait contribuer au développement d'une stratégie vaccinale prometteuse contre les ICD.

Dans cette étude nous avons choisi de tester deux facteurs de colonisation ayant montré les meilleurs résultats lors des précédents essais d'immunisation par voie muqueuse, la protéase Cwp84 et la flagelline FliC. Ces facteurs de colonisation ont été associés à un fragment de la toxine TcdB représentant le domaine B de liaison issu de la souche 630 de *C. difficile*, TcdB-B3. Ce fragment a montré dans une précédente étude un pouvoir immunogène important après administration par voie intra-péritonéale avec de l'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant (Leuzzi *et al.* 2013). Les anticorps IgG sériques ainsi produits avaient une activité neutralisante *in vitro* anti-TcdB spécifique. Par ailleurs, chez l'homme, l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TcdB spécifiques du domaine B entraîne une protection contre les récurrences en association avec un traitement antibiotique (Wilcox *et al.* 2017). L'ensemble de ces résultats montrent l'efficacité des anticorps anti-TcdB spécifiques du domaine B dans la protection contre les ICD.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'une vaccination par voie intra-rectale avec l'association de différents antigènes de *C. difficile*, Cwp84, FliC et TcdB-B3.

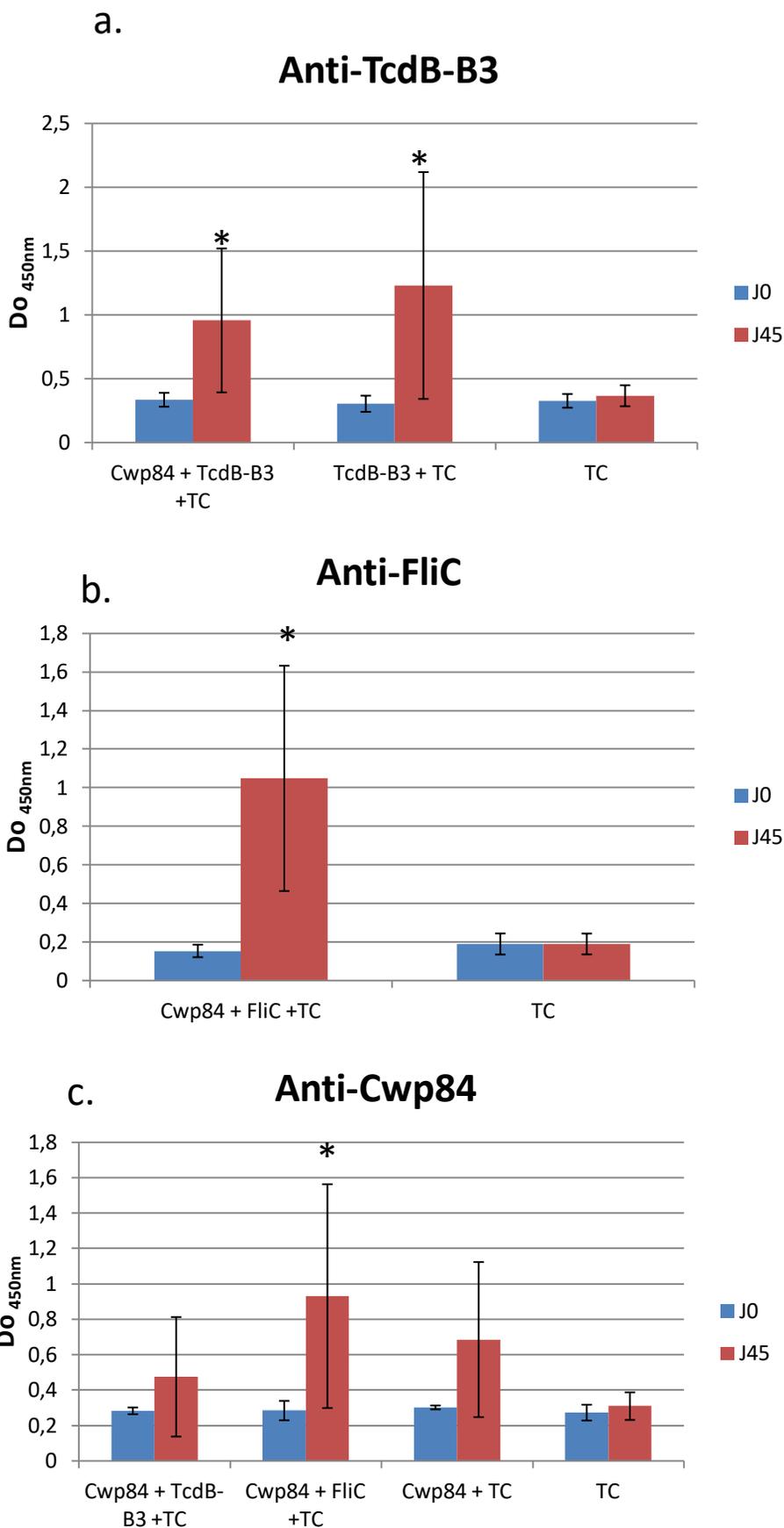
#### Matériels et méthodes.

##### Production du fragment TcdB-B3 :

Le gène codant pour TcdB-B3 a été cloné dans le plasmide pet28. Les amorces

5'-GGATCCGCAACTGGATTTGTGACTGTAGGCGATG-3' et

5'-CTCGAGCTATTTACTAATCACTAATTGAGCTGTATC -3', contenant respectivement les sites de restriction pour BamHI et XhoI, ont été utilisées pour amplifier par PCR le fragment issu du gène *tcdB* de la souche 630 de *C. difficile*. Le produit de PCR de 1545 paires de bases obtenu a été cloné dans le plasmide pBlunt puis a été cloné en phase avec une étiquette histidine dans le plasmide pet28. Ce dernier a été transféré par transformation dans la souche BL21 d'*Escherichia coli*.



**Figure 28.** Analyse par ELISA de la réponse anticorps sérique **a.** Anti TcdB-B3 **b.** Anti-FliC **c.** Anti-Cwp84. \*: différences statistiquement significative avant et après immunisations  $p < 0.05$  (test de Wilcoxon)



L'expression de la protéine recombinante TcdB-B3 a été induite par 1 mM d'IPTG en milieu LB (Lysogeny Broth) additionné de kanamycine (40µg/ml). Les bactéries ont été collectées par centrifugation et resuspendues dans un tampon dénaturant pH=7 composé de phosphate de sodium (50 mM), de chlorure de sodium (300 mM) et de de guanidine-HCl (6 M). Les bactéries ont été lysées par sonication, la fraction insoluble a été éliminée par centrifugation et filtration. La protéine recombinante a été purifiée par chromatographie d'affinité sur résine de cobalt (BD Bioscience) selon les recommandations du fabricant. La fraction d'élution contenant la protéine a été dialysée contre un tampon phosphate PBS. Le degré de pureté de la protéine TcdB-B3 a été analysé par SDS-page.

Production des protéines recombinantes Cwp84 et FliC : Ces protéines ont été produites et purifiées comme précédemment décrit (Péchiné *et al.* 2011; Batah *et al.* 2016).

#### Protocole d'immunisation chez le hamster :

Cinq groupes de hamsters femelles âgées de six semaines ont été immunisés par voie intrarectale trois fois à 15 jours d'intervalle et sous anesthésie. A chaque immunisation, un groupe de 8 hamsters a reçu 100µg de Cwp84 plus 100 µg de TcdB-B3 avec 10 µg de toxine cholérique (TC) comme adjuvant, un groupe de 8 hamsters a reçu 100µg de FliC plus 100 µg de TcdB-B3 avec 10 µg de TC, un groupe de 6 hamsters a reçu 100 µg de Cwp84 avec 10 µg de TC, un groupe de 8 hamsters ont reçu 100µg de TcdB-B3 avec 10 µg de TC, et enfin un groupe contrôle de 6 hamsters a reçu seulement 10 µg de TC. Un jour avant la première immunisation et 15 jours après la dernière immunisation, un échantillon de sang a été prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie. Quinze jours après la dernière immunisation les hamsters ont reçu par gavage de la clindamycine (50 mg/kg). Cinq jours après, les hamsters ont été infectés par des spores de la souche 630 de *C. difficile* (10<sup>5</sup> spores/hamster). La survie des animaux après infection a été suivie quotidiennement. La présence de *C. difficile* après challenge a été vérifiée par culture d'un échantillon de fèces sur gélose au sang et taurocholate (0.1%) (Figure 27).

#### Etude de la réponse humorale spécifique des antigènes administrés :

Les échantillons de sang ont été analysés par ELISA, comme précédemment décrit (Péchiné *et al.* 2013), pour détecter la réponse sérique de type anticorps anti-Cwp84, anti-TcdB-B3 et anti-FliC.

## Résultats.

Après immunisation, l'analyse de la production d'anticorps spécifiques des antigènes administrés a montré d'importantes variations inter-individuelles pour chaque groupe. Après immunisation, nous observons une production significative d'anticorps anti-TcdB-B3 pour les groupes immunisés par Cwp84 + TcdB-B3 + TC ou TcdB-B3 + TC (Figure 27 a). De même, le groupe immunisé par Cwp84 + FliC + TC a montré une production significative d'anticorps anti-FliC après immunisation (Figure 28 b). Le groupe immunisé avec Cwp84 + TcdB-B3 + TC et le groupe Cwp84 + TC n'ont pas développé de manière significative de réponse de type anticorps sérique anti-Cwp84 contrairement au groupe immunisé par Cwp84 + FliC + TC (Figure 28 c). De plus, ce groupe développait une réponse anti-Cwp84 légèrement plus importante que les autres groupes ayant aussi reçu la protéine Cwp84.

L'étude post-infection n'a pas permis de montrer une éventuelle protection contre les ICD. En effet, les hamsters non immunisés du groupe contrôle ont survécu à l'infection malgré la présence de *C. difficile* toxigène dans les fèces.

## Discussion et conclusion.

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de mortalité après infection dans le groupe contrôle malgré la présence de *C. difficile* toxigène dans les fèces. Une contamination préalable par *C. difficile* non toxigène pourrait avoir prévenu l'infection létale par une souche de *C. difficile* toxigène. Par ailleurs, le modèle d'ICD chez le hamster nécessite un traitement antibiotique afin d'altérer le microbiote intestinal et permettre la germination des spores de *C. difficile* et la colonisation intestinale. Il est possible, qu'ici, le traitement antibiotique n'ait pas suffi à l'induction du processus infectieux. C'est un problème que nous avons rencontré à plusieurs reprises au sein du laboratoire, de plus nous avons appris que ces difficultés étaient aussi rencontrées par d'autres équipes de recherche travaillant sur *C. difficile* en Angleterre.

C'est pourquoi, par la suite, nous avons dû re-valider notre modèle d'infection en modifiant le fournisseur des animaux et en améliorant les traitements antibiotiques nécessaires à la rupture de l'effet de barrière du microbiote intestinal.

Magrè l'échec de la validation du modèle d'étude après infection par *C. difficile*, l'étude de la réponse humorale sérique montre que l'association de Cwp84 avec TcdB-B3 ainsi que FliC avec TcdB-B3 dans une stratégie d'immunisation par voie intra-rectale chez le hamster permet d'induire une production d'anticorps spécifique des antigènes administrés. D'autre part, nous avons observé une réponse anti-Cwp84 légèrement supérieure lorsque cette protéine était associée à la flagelline FliC et la TC que lorsqu'elle était associée à la TC seule, ce qui encourage l'utilisation de FliC dans une stratégie d'immunisation associant plusieurs antigènes.

# Discussion

## 4. Discussion

Il existe un véritable besoin de développer de nouvelles stratégies préventives des ICD. En effet, l'ICD est considérée comme l'une des infections nosocomiales les plus communes aux Etats-Unis et en Europe et des épidémies d'ICD se sont déclarées dans de nombreux pays (Wiegand *et al.* 2012; Magill *et al.* 2014). En 2013, le centre américain pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) a classé les ICD comme un problème de santé publique majeur (CDC report, antibiotic resistance threats in the U.S., 2013). Aux Etats-Unis, l'impact économique des ICD pour les établissements de santé a été estimé à environ 4.7 milliards de dollars par an (Desai *et al.* 2016). En France, le coût supplémentaire dû aux ICD dans les hôpitaux publics a été extrapolé à 163.1 millions d'euros au niveau national (Le Monnier *et al.* 2015). De plus, la prévalence des ICD hors institutions de soin est en nette augmentation, y compris parmi les patients apparemment à faible risque, comme les jeunes adultes en bonne santé (Chitnis *et al.* 2013) et les enfants (Wendt *et al.* 2014).

L'un des problèmes majeurs lié aux ICD est le nombre important de récurrences. Le taux de récurrence après un premier épisode se situe entre 20-30 % et peut atteindre 60 % après une première récurrence (Shields *et al.* 2015). Le caractère récurrent des ICD montre l'intérêt de développer une stratégie thérapeutique protectrice à long terme. Actuellement les traitements standards antibiotiques couramment utilisés (metronidazole et vancomycine) ont un large spectre d'action et ne permettent pas de limiter le risque de récurrence. En effet, ils contribuent à l'accentuation des perturbations du microbiote intestinal et de son effet de barrière. En association avec les traitements antibiotiques, les recommandations de prévention des ICD pour limiter la dissémination de *C. difficile* impliquent un strict respect des règles d'hygiène, qui sont coûteuses et parfois difficiles à mettre en œuvre. Les vaccins prophylactiques et thérapeutiques contre *C. difficile* représenteraient une possibilité pour mettre fin à l'expansion des ICD et la dissémination de *C. difficile*. En effet, des études mathématiques montrent l'intérêt financier d'une immunité de groupe conférée par la vaccination dans le contrôle de la transmission des ICD (Lee *et al.* 2010).

Un vaccin efficace contre *C. difficile* pourrait être envisagé à la fois pour des applications prophylactiques et thérapeutiques dans plusieurs populations cibles, chez l'homme comme chez l'animal. En effet, *C. difficile* a une grande variété d'hôtes et peut être considéré comme un pathogène zoonotique. Ainsi, *C. difficile* constitue une menace non négligeable dans les élevages animaux notamment porcins, bovins et équins où les épidémies peuvent se

développer rapidement. Chez l'homme la vaccination pourrait cibler les patients à risque de développer une ICD comme par exemple les patients âgés de plus de 65 ans et les patients susceptibles d'être admis à l'hôpital et de recevoir des traitements antibiotiques. De même, les patients à risque dans les établissements de soins de longue durée et les établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) pourraient être vaccinés en prévision de leur admission. Les patients à risque de développer des récurrences d'ICD pourraient être aussi ciblés.

#### **4.1. Choix des antigènes vaccinaux**

Le développement d'une stratégie vaccinale repose dans un premier temps sur le choix des cibles thérapeutiques. En ce qui concerne *C. difficile*, plusieurs stratégies sont en cours de développement, l'une consiste à cibler les principaux facteurs de virulence que sont les toxines, l'autre consiste à cibler les facteurs de colonisation en amont de la libération des toxines dans le processus infectieux.

Les différentes stratégies d'immunisation active ciblant les toxines ont montré des résultats encourageants de neutralisation des toxines et de protection contre les ICD chez l'animal. Par ailleurs, les vaccins en cours d'essai clinique chez l'Homme ont montré des résultats prometteurs concernant l'induction d'une réponse humorale neutralisante anti-toxine. Des essais de phase III sont en cours pour évaluer l'efficacité sur la prévention des ICD et les récurrences. Cibler les toxines semble permettre d'induire une protection efficace contre les ICD, cependant cette stratégie n'a pas encore démontré son efficacité sur la diminution de la colonisation intestinale et la persistance de *C. difficile* chez l'hôte.

Une stratégie vaccinale ciblant les protéines de surface de *C. difficile* et la colonisation intestinale représente une alternative thérapeutique. La persistance de *C. difficile* dans le colon dépend de l'équilibre entre le développement de *C. difficile* et son élimination dans les selles. Le processus de colonisation fait intervenir la multiplication bactérienne et l'adhésion de la bactérie à l'épithélium intestinal d'où la persistance de la bactérie chez l'hôte (Janoir 2016).

Le processus de colonisation intestinale par *C. difficile* commence le plus souvent par la contamination de l'hôte par des spores. La surface de la spore représente donc la première cible potentielle dans une stratégie d'immunisation contre la colonisation. La couche la plus externe de la spore est l'exosporium qui est composée de plusieurs protéines : des protéines « collagen-like », BclA1, BclA2, BclA3 et des protéines riches en cystéine, protéines CdeC,

CdeM, CdeA, CdeB (Díaz-González *et al.* 2015). Il a été montré que cette couche jouait un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales Caco2 *in vitro*. Ainsi, il est possible que les spores puissent adhérer à la muqueuse intestinale, par l'intermédiaire de l'exosporium.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine sporale CdeM dans l'adhésion à la muqueuse intestinale et dans la virulence de *C. difficile*. Nous avons observé une légère diminution de l'adhésion *ex vivo* aux caecums de hamsters des spores d'une souche mutante CdeM- par rapport aux spores de la souche sauvage. De manière surprenante, la souche mutante CdeM- a montré dans un modèle hamster une virulence accrue de manière significative comparativement à la souche sauvage. Cette virulence augmentée pourrait s'expliquer par l'augmentation de la vitesse de germination observée lors d'études préliminaires et la grande sensibilité des hamsters aux ICD. Des essais de vaccination ont été réalisés afin d'évaluer l'intérêt de CdeM en tant que candidat vaccinal. Ainsi, Ghose *et al.* ont montré, dans un essai de vaccination par voie intra-péritonéale avec la protéine CdeM co-administrée avec de l'alun comme adjuvant, une importante protection contre *C. difficile* chez la souris et le hamster (Ghose *et al.* 2016a).

**Cibler les spores de *C. difficile* dans une stratégie d'immunisation permettrait d'agir sur les premières étapes de la colonisation intestinale et potentiellement permettrait de limiter la persistance de *C. difficile* chez l'hôte.**

Suite à la germination des spores, les formes végétatives se multiplient permettant la colonisation digestive. Plusieurs protéines de surface ont été caractérisées comme facteurs de colonisation et la majorité d'entre elles ont un rôle dans l'adhésion de *C. difficile* à la muqueuse intestinale. Récemment une nouvelle adhésine a été caractérisée, la lipoprotéine CD0873, exprimée à la surface de *C. difficile* et accessible aux anticorps. De plus, cette lipoprotéine adhère *in vitro* aux cellules intestinales Caco2 (Kovacs-Simon *et al.* 2014).

Au cours de notre étude, nous avons eu pour objectif de caractériser le rôle de la lipoprotéine CD0873 dans la colonisation intestinale. C'est pourquoi nous avons évalué *in vivo* de manière quantitative l'élimination dans les fèces d'une souche sauvage de *C. difficile* et de son mutant CD0873, ainsi que leur présence au niveau de la lumière intestinale et le taux de bactéries associées à la muqueuse intestinale. Cette étude a été réalisée dans deux modèles animaux: un modèle de souris dixéniques de compétition entre la souche sauvage et la souche mutante CD0873- ; un modèle de souris conventionnelles plus proche du processus naturel d'infection,

par la souche mutante CD0873- ou la souche sauvage en présence d'un microbiote complexe préalablement altéré par traitement antibiotique. Nous avons montré, dans les deux modèles, que la souche mutante CD0873- présentait une plus forte diminution de la colonisation dans les temps tardifs après infection par rapport à la souche sauvage. Ceci était caractérisé dans les deux modèles, à partir de J6 après infection, par une diminution de l'élimination de *C. difficile* dans les fèces, associée à une diminution du taux de bactéries lumineales et de bactéries associées à la muqueuse intestinale. Nous avons ainsi démontré que la lipoprotéine CD0873 pouvait être considérée comme un nouveau facteur de colonisation de *C. difficile*.

Nous avons ensuite évalué l'efficacité d'une stratégie d'immunisation par voie intrapéritonéale avec la protéine CD0873 comme antigène et l'adjuvant de Freund. Cette stratégie vaccinale a permis, à des temps tardifs après infection, une diminution significative de la colonisation intestinale comparativement aux souris non immunisées. Ceci a été corrélé à une production d'IgA et IgG intestinales et d'IgG sériques anti-CD0873. Par ailleurs, par rapport aux souris non immunisées, les souris immunisées présentaient une diminution de la sévérité de l'infection caractérisée par une absence de perte de poids et de diarrhée.

**Nos résultats suggèrent que la lipoprotéine CD0873 est un facteur de colonisation de *C. difficile* et représente une cible vaccinale prometteuse.**

Les protections partielles obtenues par des stratégies d'immunisation ciblant les facteurs de colonisation de *C. difficile* témoignent de la complexité du processus de colonisation et de la nécessité de considérer plusieurs cibles.

Lors d'une étude précédente réalisée au laboratoire dans un modèle hamster, l'immunisation par des extraits pariétaux totaux de *C. difficile* avait permis une protection partielle des hamsters vis à vis de la mortalité liée à l'ICD. Par une approche de protéomique comparative des sérums du groupe immunisé et du groupe témoin, nous avons pu mettre en évidence chez les animaux immunisés des anticorps spécifiques de protéines de surface dont des anticorps anti-SlpA, précurseur des protéines de la couche-S (Péchiné *et al.* 2013). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la protéine SlpA.

Dans un premier temps nous avons analysé la réponse de type anticorps spécifique de SlpA chez des patients atteints d'ICD simple ou récidivante. Nous avons observé un défaut d'IgG sérique anti-SlpA pour les patients développant au moins une récurrence comparativement aux patients atteints d'un seul épisode d'ICD. Nos résultats suggèrent que l'induction d'une



réponse de type anticorps sérique anti-SlpA chez des patients atteints d'ICD pourrait être associée à une protection contre un deuxième épisode d'ICD.

Puis, nous avons évalué l'intérêt du précurseur SlpA en tant qu'antigène vaccinal dans les modèles souris et hamster par immunisation par voie muqueuse intra-rectale avec la TC comme adjuvant. Nous avons démontré une efficacité partielle de cette stratégie contre la colonisation intestinale chez la souris. Ce protocole d'immunisation a permis une diminution du taux de colonisation après challenge chez les souris immunisées, de façon significative à J10 par rapport au groupe contrôle non immunisé. Ces résultats ont été corrélés à la production d'IgA sécrétoire et d'IgG sérique anti-SlpA. De plus, nous avons démontré une efficacité partielle de cette stratégie contre la virulence de *C. difficile* chez le hamster. Comparativement au groupe contrôle, un retard de mortalité après challenge chez les hamsters immunisés par SlpA et la TC a été observé. Cette protection a été corrélée à la production d'IgG sérique anti-SlpA. Dans ces deux modèles, les observations microbiologiques et cliniques corrélées aux réponses immunitaires spécifiques induites par la vaccination, démontrent l'intérêt du précurseur SlpA dans une stratégie vaccinale par voie muqueuse contre *C. difficile*.

SlpA étant le précurseur des SLPs composées de deux sous-unités HMW-SLP et LMW-SLP, ces trois protéines partagent potentiellement les mêmes épitopes. Les deux sous-unités, protéines majoritaires à la surface de *C. difficile*, interviennent notamment dans l'adhésion aux entérocytes et à la matrice extracellulaire (Calabi *et al.* 2002). Des anticorps induits par la vaccination dirigés contre les SLPs permettraient de limiter l'adhésion de *C. difficile* aux entérocytes (Merrigan *et al.* 2013). Par ailleurs, Ryan *et al.* ont montré que les deux protéines HMW-SLP et LMW-SLP pouvaient interagir avec les récepteurs TLR4 de l'immunité innée, participant ainsi à la réponse inflammatoire en tant que PAMPs (Ryan *et al.* 2011).

**Cibler la protéine SlpA et donc indirectement les deux protéines SLPs matures dans une stratégie vaccinale permettrait d'agir sur la colonisation et la virulence de *C. difficile*.**

*C. difficile* exprime à sa surface d'autres facteurs de colonisation pouvant être considérés comme des PAMPs intervenant dans la réponse inflammatoire induite lors des ICD. Ainsi la flagelline FliC, protéine structurale du corps flagellaire est capable d'agir sous forme de monomère comme un PAMP interagissant avec TLR5.

Le rôle de la flagelline FliC dans la colonisation et la virulence semble dépendre du fond génétique de *C. difficile* (Dingle *et al.* 2011; Baban *et al.* 2013). La flagelline FliC joue un rôle clé dans la pathogénicité de certaines souches hypervirulentes comme la souche 027 R20291 (Batah *et al.* 2017). La flagelline FliC participerait à l'adhésion de *C. difficile* à la muqueuse intestinale et en association avec les toxines, FliC interviendrait dans l'exacerbation de la réponse inflammatoire par l'interaction avec les récepteurs TLR5 des cellules épithéliales et de l'immunité innée. Cibler la flagelline FliC par des anticorps spécifiques, permettrait de limiter l'adhésion de *C. difficile* et de diminuer l'interaction FliC/TLR5 intervenant dans la réponse inflammatoire. Ainsi, dans une stratégie d'immunisation passive, Ghose *et al.* après avoir administré un sérum hyper-immun anti-FliC à des souris par voie intra-péritonéale ont observé une forte protection des souris contre l'infection induite par la souche UK1 027 (80% de survie après challenge). Dans cette même étude, Ghose *et al.* ont aussi testé la flagelline FliC dans une stratégie d'immunisation active par voie intra-péritonéale dans des modèles souris et hamsters avec l'alun comme adjuvant. Chez la souris, l'immunisation a induit une forte réponse immune systémique IgG spécifique de FliC. En outre, les souris immunisées étaient totalement protégées (100%) contre la souche épidémique 027 UK1. Les hamsters immunisés n'étaient que partiellement protégés (43 %) contre la souche 630 $\Delta$ erm de *C. difficile* (Ghose *et al.* 2016b). Au cours de notre étude, nous avons montré que l'immunisation avec la flagelline FliC comme antigène par différentes voies d'administration dans un modèle hamster permettait d'induire une protection partielle contre *C. difficile*. De manière similaire à l'étude de Ghose *et al.*, l'immunisation par voie intra-péritonéale sans adjuvant induisait 33 % de protection contre une ICD létale.

**L'ensemble de ces résultats montrent l'intérêt de cibler FliC dans une stratégie d'immunisation contre *C. difficile*.**

Ainsi, les différents essais d'immunisation en modèle animal n'ont montré qu'une efficacité partielle contre la colonisation intestinale et la virulence de *C. difficile* et suggèrent la nécessité de considérer plusieurs cibles vaccinales. Par exemple, la combinaison de facteurs de colonisation et de facteurs de virulence permettrait de cibler les différentes étapes de la physiopathologie des ICD de la colonisation à la libération des toxines et d'ainsi induire une protection complète contre les ICD.

Au cours de notre étude, nous avons choisi de combiner un facteur de colonisation avec un facteur de virulence dans une stratégie d'immunisation par voie intra-rectale chez le hamster. Pour cela nous avons choisi d'associer la protéase Cwp84 ou la flagelline FliC avec un

fragment correspondant au domaine de liaison de TcdB (TcdB-B3). Les protéines Cwp84 et FliC ont montré les meilleurs résultats de protection contre *C. difficile* dans des essais de vaccination par voie muqueuse (Sandolo *et al.* 2011). La toxine B est considérée comme la cible la plus efficace dans une stratégie d'immunisation passive chez l'homme (Wilcox *et al.* 2017). L'étude de la réponse immunitaire induite a montré que l'immunisation par voie intrarectale avec les combinaisons Cwp84 /TcdB-B3 ou FliC /TcdB-B3 avec la TC comme adjuvant permettait d'induire, de manière significative, une réponse de type anticorps sérique spécifique de l'ensemble des antigènes reçus. Malheureusement, après immunisation, le modèle d'infection n'a pas pu être validé en raison d'une absence de mortalité dans le groupe contrôle. Cependant, ces résultats montrent le potentiel d'une telle stratégie d'immunisation contre *C. difficile*.

#### **4.2. Choix de la voie d'immunisation**

Après le choix des antigènes, le développement d'une stratégie vaccinale repose sur le choix de la voie d'administration. *C. difficile* étant un entéropathogène non invasif, l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse au plus près du site de l'infection semble être le meilleur choix. La protection induite par des vaccins contre les infections non invasives gastro-intestinales dues à *V. cholerae* ou *Escherichia coli* enterotoxinogènes (ETEC) est conférée principalement par des IgAs spécifiques et par l'induction d'une réponse immunitaire mémoire (Holmgren and Czerkinsky 2005). Ainsi, une stratégie vaccinale ayant pour objectif de prévenir l'altération de l'épithélium intestinal et de cibler les premières étapes du processus infectieux de *C. difficile* devrait idéalement permettre l'induction d'une réponse IgAs au niveau de la lumière intestinale en plus d'une réponse systémique de type anticorps nécessitant le passage des anticorps de la circulation sanguine vers la muqueuse intestinale.

L'induction d'une réponse immunitaire muqueuse dépend de la voie d'administration. La réponse induite par voie muqueuse est la plus forte au niveau du site d'induction (Holmgren and Czerkinsky 2005). Pour induire préférentiellement une forte réponse au niveau intestinal, deux voies d'immunisation sont envisageables chez l'homme, la voie rectale et la voie orale. L'immunisation par voie rectale semble induire essentiellement une réponse immunitaire au niveau du rectum, une plus faible réponse au niveau du colon et une réponse nulle au niveau de l'intestin grêle. En revanche, l'immunisation par voie orale induit préférentiellement une

réponse immunitaire au niveau de l'intestin grêle et une réponse plus faible au niveau du colon. Bien que la voie rectale semble plus adaptée pour induire une réponse immunitaire au niveau du colon et qu'elle ait montré son efficacité chez l'animal dans le développement d'une stratégie vaccinale contre *C. difficile*, cette voie d'administration est difficilement envisageable chez l'homme. En revanche, la voie orale offre l'avantage de conférer au patient un meilleur confort et une meilleure acceptation. Afin de cibler l'intestin lors d'une immunisation par voie orale, il est nécessaire de développer une formulation particulière afin de protéger l'antigène d'une éventuelle dégradation par le système digestif et permettre une libération ciblée au niveau du colon.

Le développement d'une stratégie vaccinale par voie muqueuse est indissociable du choix de l'adjuvant. Les adjuvants sont des substances capables de faciliter l'induction d'une réponse immunitaire innée, et associés à un antigène vaccinal ils permettent le développement d'une réponse immune adaptative spécifique. De nombreuses substances, souvent sous forme particulaire ou d'émulsion ont des propriétés adjuvantes (Aoshi 2017). Leur mode d'action peut être catégorisé en trois classes : les agonistes de récepteurs de l'immunité innée (PAMPs); les inducteurs de danger (damage-associated molecular pattern ou DAMPs); et les systèmes inertes de présentation d'antigènes.

Au cours de notre étude, nous avons développé une stratégie d'immunisation par voie orale permettant une libération colique de l'antigène. Des gélules gastro-résistantes limitant la dégradation de l'antigène au niveau de l'estomac et contenant la flagelline FliC encapsulée dans des billes de pectine ont été administrées par voie orale pour une libération colique de FliC. La pectine à l'avantage d'être un polymère biocompatible et d'être dégradée par l'action d'enzymes pectinolytiques au niveau du colon, facilitant la libération de l'antigène au niveau du site inducteur comme un adjuvant muqueux. Lors d'une précédente étude, cette stratégie s'était montrée partiellement efficace en utilisant la protéase Cwp84 comme antigène (Sandolo *et al.* 2011). Lors d'un essai d'immunisation avec la flagelline FliC, nous avons comparé différentes voies d'administration de FliC chez le hamster. Ainsi, l'administration par voie orale de la flagelline FliC encapsulée dans des billes de pectine a permis d'induire une protection significative de 50% des hamsters contre une infection létale à *C. difficile*. En revanche, l'administration par voie orale de FliC non encapsulée ne permettait aucune protection. Par ailleurs, nous avons observé une meilleure protection après administration par voie orale de FliC encapsulée dans des billes de pectine que celle observée après l'administration de FliC non-encapsulée par voie intra-rectale ou intra-péritonéale. Cependant,

une production d'anticorps sériques anti-FliC n'a été observée qu'après immunisation par voie intra-péritonéale. Ceci suggère qu'à côté d'une réponse systémique de type anticorps d'autres mécanismes de protection pourraient être induits par les voies d'immunisation muqueuses. On peut supposer que l'administration de FliC par voie muqueuse induise préférentiellement une réponse anticorps au niveau local plutôt qu'au niveau systémique.

**Ces résultats montrent l'efficacité de l'encapsulation de FliC dans des billes de pectine pour induire une protection contre les ICD et le potentiel de l'encapsulation d'antigène dans des billes de pectine dans une stratégie d'immunisation par voie orale .**

Pour l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse d'autres adjuvants peuvent être utilisés. Par exemple, les adjuvants de type PAMPs sont capables de reconnaître et activer les récepteurs de types PRRs (pathogen recognition receptors) tels que les TLRs, les récepteurs RIG-I-like (retinoic acid-inducible gene I) (RLRs) et les récepteurs Nod-like (NLRs) induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires. On peut citer par exemple le c-di-GMP, agoniste du récepteur intracellulaire STING (stimulator of interferon genes) qui entraîne la production d'IFN. Par voie nasale, le c-di-GMP induit la production d'IL-1, IL-6 et IL-33 par les cellules dendritique (Blaauboer *et al.* 2015) et une réponse Th1 et Th17 (Madhun *et al.* 2011). La flagelline agoniste de TLR5 est reconnue comme un adjuvant de type PAMP. Les TLR5 sont exprimés à la surface de plusieurs cellules et au niveau de la muqueuse intestinale au niveau baso-latéral des cellules épithéliales et à la surface des cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> de la lamina propria. L'activation de ces cellules dendritiques par la flagelline induit une réponse Th17 et un switch isotypique IgA au niveau de la muqueuse intestinale. Ainsi la flagelline représente un adjuvant muqueux prometteur (Uematsu *et al.* 2008).

Au cours de notre étude, nous avons évalué l'intérêt d'utiliser la flagelline FliC de *C. difficile* comme adjuvant dans une stratégie de vaccination par voie muqueuse, premièrement en utilisant l'ovalbumine comme antigène puis le précurseur SlpA.

Dans un premier temps, nous avons comparé la capacité adjuvante de FliC avec la flagelline de *Salmonella* Typhimurium FLA-ST et la TC en utilisant l'ovalbumine (OVA) comme antigène par voie rectale. Par ailleurs, nous avons comparé l'activité adjuvante de FliC par voie rectale et par voie intra-péritonéale. L'étude de la réponse immunitaire muqueuse et systémique a montré que l'immunisation par voie intra-rectale et par voie intra-péritonéale avec FliC comme adjuvant et l'OVA comme antigène était capable d'induire une réponse

humorale spécifique de l'OVA au niveau de la muqueuse intestinale et au niveau systémique. Cependant, la voie intra-péritonéale a induit une réponse IgA et IgG plus forte que la voie intra-rectale. Nous avons aussi montré que par voie intra-rectale la TC et la flagelline FliC étaient capables d'induire des réponses immunitaires de nature différente, la TC induisait préférentiellement une réponse IgG systémique et locale alors que FliC induisait une réponse IgG systémique et une réponse IgA locale. De plus, la flagelline FliC de *C. difficile* semblait avoir une capacité adjuvante accrue par rapport à FLA-ST.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que dans une stratégie d'immunisation intra-rectale ciblant le précurseur SlpA afin de prévenir la colonisation par *C. difficile*, FliC comme adjuvant était aussi efficace que la TC. En effet, avec les deux adjuvants l'immunisation entraînait une diminution du taux de colonisation par *C. difficile*, significative à J10 après challenge. L'ensemble de ces résultats montre que FliC peut être utilisé comme adjuvant en alternative à la toxine cholérique par voie intra-rectale.

**L'ensemble de l'étude sur la flagelline FliC de *C. difficile* a permis de confirmer sa forte immunogénicité et de démontrer que cette protéine pouvait à la fois être utilisée comme un adjuvant et un antigène dans une stratégie vaccinale contre *C. difficile*.**

#### **4.3. Corrélat de protection après immunisation par voie muqueuse**

Ces études soulèvent la question de la nature de la réponse immunitaire induite au niveau de la muqueuse intestinale nécessaire pour entraîner une protection contre *C. difficile*. Les facteurs de colonisation et de virulence de *C. difficile* sont maintenant bien définis et caractérisés, cependant les mécanismes de protection induits par la vaccination par voie muqueuse ne sont pas encore suffisamment décrits.

A côté de la réponse immunitaire adaptative, la réponse innée peut aussi être impliquée. Ainsi, Jarchum *et al.* ont montré que l'administration prophylactique de la flagelline FLA-ST par voie intra-péritonéale, avant, pendant et après l'infection par *C. difficile*, protégeait des souris de l'infection. Bien que le mécanisme d'action de la protection n'ait pas été décrit, les auteurs supposent que l'induction de la réponse immunitaire innée médiée par FliC via l'activation des TLR5 permettrait de protéger d'une ICD.

L'induction d'une réponse IgAs spécifique locale semble être importante, cependant peu d'études caractérisent le rôle des IgAs anti-*C. difficile*. Il serait ainsi intéressant de déterminer

l'efficacité d'une réponse IgAs spécifique dirigée contre les facteurs de colonisation de *C. difficile*.

Lors de ce travail, les techniques d'analyse de la réponse immunitaire ont été améliorées au laboratoire, notamment en initiant la technique ELISPOT permettant la détection des cellules productrices d'anticorps. Nous nous sommes intéressés principalement à l'étude de la réponse humorale induite par la vaccination ; afin d'améliorer l'étude du corrélat de protection, nous pourrions nous intéresser à la réponse immunitaire de type cellulaire, au travers de l'étude des cellules T.

Enfin, le premier objectif d'une vaccination est d'induire une mémoire immunitaire afin d'obtenir une protection à long terme. En ce qui concerne *C. difficile* une telle réponse permettrait notamment de prévenir les récurrences. Evaluer la réponse mémoire serait un excellent moyen de caractériser l'efficacité d'une stratégie vaccinale contre *C. difficile*.

**Conclusion**  
**Perspectives**



Au cours de notre étude nous avons identifié plusieurs cibles vaccinales d'intérêt situées à la surface de *C. difficile*. Des essais d'immunisation avec le précurseur SlpA, la flagelline FliC et la protéine CD0873 comme antigène ont permis d'obtenir une diminution de la colonisation intestinale par *C. difficile* et une protection partielle contre l'infection. La flagelline FliC est particulièrement intéressante compte tenu de ses propriétés adjuvantes. Nous avons privilégié la voie muqueuse pour induire une réponse protectrice au niveau intestinal. Dans un premier temps la voie intra-rectale a été utilisée, puis la voie orale a été développée pour une application future chez l'homme.

L'un des inconvénients de la voie muqueuse est la difficulté d'induire une réponse immunitaire suffisante en raison de la forte régulation et de la tolérance présente au niveau intestinal. Il serait intéressant d'améliorer l'efficacité de la vaccination par cette voie, en identifiant le site inducteur le plus efficace contre *C. difficile* entre le colon et l'intestin grêle. En effet, le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (« gut associated lymphoid tissue » GALT) est différent entre ces deux parties de l'intestin, il est plus développé au niveau de l'intestin grêle qu'au niveau du colon (Mowat and Agace 2014). Les résultats prometteurs obtenus après immunisation par voie orale avec la flagelline FliC encapsulée dans des billes de pectine encouragent l'utilisation d'une telle stratégie pour d'autres antigènes. Par ailleurs, nous pourrions tester différentes techniques de vectorisation d'antigène pour une administration par voie orale. Notamment, cibler les cellules M siégeant aux niveaux des plaques de Peyers le long de l'épithélium, permettrait de faciliter la prise en charge des antigènes par le système immunitaire muqueux (Kim and Jang 2017).

Afin d'améliorer l'immunogénicité des antigènes administrés par voie muqueuse, d'autres adjuvants muqueux peuvent être testés, on peut citer par exemple l'utilisation des nanoparticules comme vecteurs d'antigènes et activateurs de la réponse immunitaire innée. Il existe une extrême diversité de systèmes de présentation d'antigène, caractérisés par leur composition, leur taille, leur charge et leur propriété immunostimulante. On peut citer par exemple les adjuvants à liposomes cationiques comme CAF01 qui sont capables d'induire notamment une forte réponse IgA et Th17 au niveau des muqueuses. Par ailleurs, il serait aussi possible d'améliorer l'immunogénicité de certains antigènes de *C. difficile* en construisant des protéines fusion entre un antigène cible et une protéine à propriétés immunostimulantes au niveau de la muqueuse. Par exemple, les domaines N-terminal et C-

terminal de la flagelline FliC (Mizel and Bates 2010; Qian *et al.* 2016) et la sous-unité B de la TC (Stratmann 2015), indispensables pour l'activité immunostimulante respective de ces deux protéines, pourraient être fusionnés à un antigène cible.

Afin d'améliorer la protection, nous pourrions lors de futurs essais associer quelques variants majeurs des antigènes (en particulier SlpA) et ainsi tester l'efficacité de la vaccination vis-à-vis de différentes souches de *C. difficile* circulantes. Par ailleurs, le processus infectieux de *C. difficile* étant multifactoriel, la caractérisation de nouveaux facteurs de colonisation permettrait de mieux comprendre cette étape clé de la physiopathologie de l'infection. Nous avons au cours de notre étude démontré le rôle de la lipoprotéine CD0873 dans la colonisation intestinale par *C. difficile*, et son intérêt comme antigène vaccinal. Nous avons aussi montré le rôle de la protéine sporale CdeM dans l'adhésion des spores à la muqueuse intestinale *ex vivo*. Ainsi afin d'améliorer la protection vaccinale, il serait intéressant de cibler à la fois la spore, les facteurs de colonisation et de virulence de la forme végétative ce qui permettrait d'agir ainsi sur les différentes étapes du processus infectieux.

Par ailleurs, l'un des objectifs de la vaccination d'une population est de conférer une immunité de groupe et de prévenir la dissémination du pathogène. Au cours de nos modèles d'étude, l'infection était réalisée par l'administration directe d'une suspension de spores ou de formes végétatives aux animaux. Nous avons ainsi étudié l'efficacité de l'immunisation sur la colonisation intestinale par *C. difficile*. Nous pourrions mettre au point un modèle animal d'étude de la transmission de *C. difficile*, permettant ainsi d'évaluer l'effet de la vaccination sur la dissémination de la bactérie dans l'environnement.

**Références  
bibliographiques**

- Abt MC, Lewis BB, Caballero S, Xiong H, Carter RA, Sušac B, Ling L, Leiner I, Pamer EG (2015) Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host Microbe* 18:27–37. doi: 10.1016/j.chom.2015.06.011
- Abt MC, McKenney PT, Pamer EG (2016) *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol* 14:609–620. doi: 10.1038/nrmicro.2016.108
- Adlerberth AC Marina Cerquetti, Isabelle Poilane, Agnes Wold Ingegerd (2000) Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract Part 1: Bacteria/host Interactions. *Microb Ecol Health Dis* 12:223–239. doi: 10.1080/089106000750060486
- Alasmari F, Seiler SM, Hink T, Burnham C-AD, Dubberke ER (2014) Prevalence and Risk Factors for Asymptomatic *Clostridium difficile* Carriage. *Clin Infect Dis* 59:216–222. doi: 10.1093/cid/ciu258
- Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Harmanus C, Kuijper E, García ME (2017) Subtyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078/126 isolates of human and animal origin. *Vet Microbiol* 199:15–22. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.001
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SLR, Cookson BT, Logan SM, Aderem A (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9247–9252. doi: 10.1073/pnas.0502040102
- Anderson DJ, Rojas LF, Watson S, Knelson LP, Pruitt S, Lewis SS, Moehring RW, Sickbert Bennett EE, Weber DJ, Chen LF, Sexton DJ, CDC Prevention Epicenters Program (2017) Identification of novel risk factors for community-acquired *Clostridium difficile* infection using spatial statistics and geographic information system analyses. *PloS One* 12:e0176285. doi: 10.1371/journal.pone.0176285
- Anderson JK, Smith TG, Hoover TR (2010) Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol* 18:30. doi: 10.1016/j.tim.2009.11.001
- Anjuwon-Foster BR, Tamayo R (2017) A genetic switch controls the production of flagella and toxins in *Clostridium difficile*. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1006701
- Aoshi T (2017) Modes of Action for Mucosal Vaccine Adjuvants. *Viral Immunol*. doi: 10.1089/vim.2017.0026
- Aronsson B, Granström M, Möllby R, Nord CE (1985) Serum antibody response to *Clostridium difficile* toxins in patients with *Clostridium difficile* diarrhoea. *Infection* 13:97–101.
- Aubry A, Hussack G, Chen W, KuoLee R, Twine SM, Fulton KM, Foote S, Carrillo CD, Tanha J, Logan SM (2012) Modulation of Toxin Production by the Flagellar Regulon in *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 80:3521–3532. doi: 10.1128/IAI.00224-12
- Ausiello CM, Cerquetti M, Fedele G, Spensieri F, Palazzo R, Nasso M, Frezza S, Mastrantonio P (2006) Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes Infect Inst Pasteur* 8:2640–2646. doi: 10.1016/j.micinf.2006.07.009
- Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR, Kansau I, Collignon A, Minton NP (2013) The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PloS One* 8:e73026. doi: 10.1371/journal.pone.0073026
- Baines SD, Wilcox MH (2015) Antimicrobial Resistance and Reduced Susceptibility in *Clostridium difficile*: Potential Consequences for Induction, Treatment, and Recurrence of *C. difficile* Infection. *Antibiotics* 4:267–298. doi: 10.3390/antibiotics4030267

- Barbut F, Bouée S, Longepierre L, Goldberg M, Bensoussan C, Levy-Bachelot L (2017) Excess mortality between 2007 and 2014 among patients with *Clostridium difficile* infection: a French Health Insurance Database analysis. *J Hosp Infect*. doi: 10.1016/j.jhin.2017.07.006
- Barbut F, Ramé L, Petit A, Suzon L, de Chevigny A, Eckert C, pour le réseau français EUCLID (2015) [Prevalence of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea: results of a French prospective multicenter bi-annual point prevalence study]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983 44:e75-83. doi: 10.1016/j.lpm.2014.09.021
- Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC (2000) Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38:2386–2388.
- Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Givskov M, Whitchurch CB, Engel JN, Tolker-Nielsen T (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 10:2331–2343. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x
- Barketi-Klai A, Monot M, Hoys S, Lambert-Bordes S, Kuehne SA, Minton N, Collignon A, Dupuy B, Kansau I (2014) The flagellin FliC of *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during in vivo infection. *PLoS ONE* 9:e96876. doi: 10.1371/journal.pone.0096876
- Barra-Carrasco J, Olguin-Araneda V, Plaza-Garrido A, Miranda-Cardenas C, Cofre-Araneda G, Pizarro-Guajardo M, Sarker MR, Paredes-Sabja D (2013) The *Clostridium difficile* Exosporium Cysteine (CdeC)-Rich Protein Is Required for Exosporium Morphogenesis and Coat Assembly. *J Bacteriol* 195:3863–3875. doi: 10.1128/JB.00369-13
- Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB (1978) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med* 298:531–534. doi: 10.1056/NEJM197803092981003
- Batah J, Denève-Larrazet C, Jolivot P-A, Kuehne S, Collignon A, Marvaud J-C, Kansau I (2016) *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in epithelial cells. *Anaerobe* 38:116–124. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.01.002
- Batah J, Kobeissy H, Pham PTB, Denève-Larrazet C, Kuehne S, Collignon A, Janoir-Jouveshomme C, Marvaud J-C, Kansau I (2017) *Clostridium difficile* flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins. *Sci Rep* 7:3256. doi: 10.1038/s41598-017-03621-z
- Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ, ECDIS Study Group (2011) *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet Lond Engl* 377:63–73. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61266-4
- Beaugerie L, Flahault A, Barbut F, Atlan P, Lalande V, Cousin P, Cadilhac M, Petit J-C, Study Group (2003) Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther* 17:905–912.
- Bertolo L, Boncheff AG, Ma Z, Chen Y-H, Wakeford T, Friendship RM, Rosseau J, Weese JS, Chu M, Mallozzi M, Vedantam G, Monteiro MA (2012) *Clostridium difficile* carbohydrates: glucan in spores, PSII common antigen in cells, immunogenicity of PSII in swine and synthesis of a dual C. difficile-ETEC conjugate vaccine. *Carbohydr Res* 354:79–86. doi: 10.1016/j.carres.2012.03.032
- Bignardi GE (1998) Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 40:1–15.
- Biller P, Shank B, Lind L, Brennan M, Tkatch L, Killgore G, Thompson A, McDonald LC (2007) Moxifloxacin therapy as a risk factor for *Clostridium difficile*-associated disease during an outbreak: attempts to control a new epidemic strain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:198–201. doi: 10.1086/511789
- Bischoff SC (2016) Microbiota and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 19:26–30. doi: 10.1097/MCO.0000000000000242

- Blaauboer SM, Mansouri S, Tucker HR, Wang HL, Gabrielle VD, Jin L (2015) The mucosal adjuvant cyclic di-GMP enhances antigen uptake and selectively activates pinocytosis-efficient cells in vivo. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.06670
- Bloomfield LE, Riley TV (2016) Epidemiology and Risk Factors for Community-Associated *Clostridium difficile* Infection: A Narrative Review. *Infect Dis Ther* 5:231–251. doi: 10.1007/s40121-016-0117-y
- Borren NZ, Ghadermarzi S, Hutfless S, Ananthakrishnan AN (2017) The emergence of *Clostridium difficile* infection in Asia: A systematic review and meta-analysis of incidence and impact. *PLoS One* 12:e0176797. doi: 10.1371/journal.pone.0176797
- Borriello SP, Welch AR, Barclay FE, Davies HA (1988) Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. *J Med Microbiol* 25:191–196.
- Britton RA, Young VB (2014) Role of the Intestinal Microbiota in Resistance to Colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology* 146:1547–1553. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.059
- Bruxelle J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S (2016) Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models. *Anaerobe* 37:78–84. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.010
- Buonomo EL, Madan R, Pramoongjago P, Li L, Okusa MD, Petri WA (2013) Role of interleukin 23 signaling in *Clostridium difficile* colitis. *J Infect Dis* 208:917–920. doi: 10.1093/infdis/jit277
- Cairns MD, Preston MD, Hall CL, Gerding DN, Hawkey PM, Kato H, Kim H, Kuijper EJ, Lawley TD, Pituch H, Reid S, Kullin B, Riley TV, Solomon K, Tsai PJ, Weese JS, Stabler RA, Wren BW (2017) Comparative Genome Analysis and Global Phylogeny of the Toxin Variant *Clostridium difficile* PCR Ribotype 017 Reveals the Evolution of Two Independent Sublineages. *J Clin Microbiol* 55:865–876. doi: 10.1128/JCM.01296-16
- Cairns MD, Stabler RA, Shetty N, Wren BW (2012) The continually evolving *Clostridium difficile* species. *Future Microbiol* 7:945–957. doi: 10.2217/fmb.12.73
- Calabi E, Calabi F, Phillips AD, Fairweather NF (2002) Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* 70:5770–5778.
- Calabi E, Ward S, Wren B, Paxton T, Panico M, Morris H, Dell A, Dougan G, Fairweather N (2001) Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol* 40:1187–1199.
- Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y (2005) Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- $\gamma$  Production by Memory CD4+ T Cells. *J Immunol* 175:1551–1557. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1551
- Carter GP, Chakravorty A, Pham Nguyen TA, Mileto S, Schreiber F, Li L, Howarth P, Clare S, Cunningham B, Sambol SP, Cheknis A, Figueroa I, Johnson S, Gerding D, Rood JI, Dougan G, Lawley TD, Lyras D (2015) Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *mBio* 6:e00551. doi: 10.1128/mBio.00551-15
- Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, Rood JI (2007) Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J Bacteriol* 189:7290–7301. doi: 10.1128/JB.00731-07
- Carter GP, Rood JI, Lyras D (2012) The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. *Trends Microbiol* 20:21–29. doi: 10.1016/j.tim.2011.11.003
- Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP (2010) The emergence of “hypervirulence” in *Clostridium difficile*. *Int J Med Microbiol IJMM* 300:387–395. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.008

- 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. doi: 10.1006/mpat.2000.0356
- Chang VT, Nelson K (2000) The role of physical proximity in nosocomial diarrhea. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 31:717–722. doi: 10.1086/314030
- Charlton TM, Kovacs-Simon A, Michell SL, Fairweather NF, Tate EW (2015) Quantitative Lipoproteomics in *Clostridium difficile* Reveals a Role for Lipoproteins in Sporulation. *Chem Biol* 22:1562–1573. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.10.006
- Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, Nanthakumar N, Cheknis A, Gerding DN, Kelly CP (2008) A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology* 135:1984–1992. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.002
- Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, Winston LG, Bamberg WM, Lyons C, Farley MM, Dumyati GK, Wilson LE, Beldavs ZG, Dunn JR, Gould LH, MacCannell DR, Gerding DN, McDonald LC, Lessa FC (2013) Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern Med* 173:1359–1367. doi: 10.1001/jamainternmed.2013.7056
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, Society for Healthcare Epidemiology of America, Infectious Diseases Society of America (2010) Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 31:431–455. doi: 10.1086/651706
- Collins CE, Ayturk MD, Flahive JM, Emhoff TA, Anderson FA, Santry HP (2014a) Epidemiology and outcomes of community-acquired *Clostridium difficile* infections in Medicare beneficiaries. *J Am Coll Surg* 218:1141–1147.e1. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2014.01.053
- Collins DA, Gasem MH, Habibie TH, Arinton IG, Hendriyanto P, Hartana AP, Riley TV (2017a) Prevalence and molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Indonesia. *New Microbes New Infect* 18:34–37. doi: 10.1016/j.nmni.2017.04.006
- Collins DA, Putsathit P, Elliott B, Riley TV (2017b) Laboratory-based surveillance of *Clostridium difficile* strains circulating in the Australian healthcare setting in 2012. *Pathology (Phila)* 49:309–313. doi: 10.1016/j.pathol.2016.10.013
- Collins LE, Lynch M, Marszalowska I, Kristek M, Rochfort K, O’Connell M, Windle H, Kelleher D, Loscher CE (2014b) Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. *Microbes Infect* 16:391–400. doi: 10.1016/j.micinf.2014.02.001
- Cowardin CA, Kuehne SA, Buonomo EL, Marie CS, Minton NP, Petri WA (2015) Inflammasome activation contributes to interleukin-23 production in response to *Clostridium difficile*. *mBio*. doi: 10.1128/mBio.02386-14
- Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK (2005) Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 175:8051–8059.
- Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ (2009) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 15:1053–1066. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03098.x
- Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ (2016) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 22:S63–S81. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.010

- Crowther GS, Chilton CH, Todhunter SL, Nicholson S, Freeman J, Baines SD, Wilcox MH (2014) Comparison of planktonic and biofilm-associated communities of *Clostridium difficile* and indigenous gut microbiota in a triple-stage chemostat gut model. *J Antimicrob Chemother* 69:2137–2147. doi: 10.1093/jac/dku116
- Dang THT, de la Riva L, Fagan RP, Storck EM, Heal WP, Janoir C, Fairweather NF, Tate EW (2010) Chemical probes of surface layer biogenesis in *Clostridium difficile*. *ACS Chem Biol* 5:279–285. doi: 10.1021/cb9002859
- Dantes R, Mu Y, Hicks LA, Cohen J, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Farley MM, Holzbauer S, Meek J, Phipps E, Wilson L, Winston LG, McDonald LC, Lessa FC (2015) Association Between Outpatient Antibiotic Prescribing Practices and Community-Associated *Clostridium difficile* Infection. *Open Forum Infect Dis*. doi: 10.1093/ofid/ofv113
- Darkoh C, Turnwald BP, Koo HL, Garey KW, Jiang Z-D, Aitken SL, DuPont HL (2014) Colonic immunopathogenesis of *Clostridium difficile* infections. *Clin Vaccine Immunol* 21:509–517. doi: 10.1128/CVI.00770-13
- Davies AH, Roberts AK, Shone CC, Acharya KR (2011) Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins. *Biochem J* 436:517–526. doi: 10.1042/BJ20110106
- Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, Wilcox MH, EUCLID study group (2016) Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294
- Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmée M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, von Müller L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Norén T, Nováková E, Nyč O, Rupnik M, Schmid D, Wilcox MH (2014) Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis* 14:1208–1219. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70991-0
- de la Riva L, Willing SE, Tate EW, Fairweather NF (2011) Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 193:3276–3285. doi: 10.1128/JB.00248-11
- Deakin LJ, Clare S, Fagan RP, Dawson LF, Pickard DJ, West MR, Wren BW, Fairweather NF, Dougan G, Lawley TD (2012) The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun* 80:2704–2711. doi: 10.1128/IAI.00147-12
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ (2014) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 20 Suppl 2:1–26. doi: 10.1111/1469-0691.12418
- Derman Y, Söderholm H, Lindström M, Korkeala H (2015) Role of csp genes in NaCl, pH, and ethanol stress response and motility in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Food Microbiol* 46:463–470. doi: 10.1016/j.fm.2014.09.004
- Desai K, Gupta SB, Dubberke ER, Prabhu VS, Browne C, Mast TC (2016) Epidemiological and economic burden of *Clostridium difficile* in the United States: estimates from a modeling approach. *BMC Infect Dis* 16:303. doi: 10.1186/s12879-016-1610-3
- Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C, Rolston DDK, Sferra TJ, Hernandez AV, Donskey CJ (2013) Community-associated *Clostridium difficile* infection and antibiotics: a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 68:1951–1961. doi: 10.1093/jac/dkt129
- Di Bella S, Friedrich AW, García-Almodóvar E, Gallone MS, Taglietti F, Topino S, Galati V, Johnson E, D'Arezzo S, Petrosillo N (2015) *Clostridium difficile* infection among hospitalized HIV-infected



- individuals: epidemiology and risk factors: results from a case-control study (2002-2013). *BMC Infect Dis* 15:194. doi: 10.1186/s12879-015-0932-x
- Diab SS, Songer G, Uzal FA (2013) *Clostridium difficile* infection in horses: a review. *Vet Microbiol* 167:42–49. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.032
- Díaz-González F, Milano M, Olguin-Araneda V, Pizarro-Cerda J, Castro-Córdova P, Tzeng S-C, Maier CS, Sarker MR, Paredes-Sabja D (2015) Protein composition of the outermost exosporium-like layer of *Clostridium difficile* 630 spores. *J Proteomics* 123:1–13. doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.035
- Dingle KE, Didelot X, Ansari MA, Eyre DW, Vaughan A, Griffiths D, Ip CLC, Batty EM, Golubchik T, Bowden R, Jolley KA, Hood DW, Fawley WN, Walker AS, Peto TE, Wilcox MH, Crook DW (2013) Recombinational switching of the *Clostridium difficile* S-layer and a novel glycosylation gene cluster revealed by large-scale whole-genome sequencing. *J Infect Dis* 207:675–686. doi: 10.1093/infdis/jis734
- Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD (2011) Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun* 79:4061–4067. doi: 10.1128/IAI.05305-11
- Donskey CJ, Kundrapu S, Deshpande A (2015) Colonization versus carriage of *Clostridium difficile*. *Infect Dis Clin North Am* 29:13–28. doi: 10.1016/j.idc.2014.11.001
- Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, Kelly CP (2004) Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:237–242. doi: 10.1016/j.femsim.2004.03.007
- Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G (2013) Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic Microbiol* 53:1–8. doi: 10.1002/jobm.201100335
- Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S (2008) *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol* 57:685–689. doi: 10.1099/jmm.0.47775-0
- Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB (2001) *Salmonella* flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J Immunol Baltim Md* 1950 167:7009–7016.
- Eckert C, Coignard B, Hebert M, Tarnaud C, Tessier C, Lemire A, Burghoffer B, Noel D, Barbut F, ICD-Raisin Working Group (2013) Clinical and microbiological features of *Clostridium difficile* infections in France: the ICD-RAISIN 2009 national survey. *Médecine Mal Infect* 43:67–74. doi: 10.1016/j.medmal.2013.01.004
- Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, Berger P, Petit A, De Chevigny A, Jean-Pierre H, Nebbad B, Camiade S, Meckenstock R, Lalande V, Marchandin H, Barbut F (2015) Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect* 3:12–17. doi: 10.1016/j.nmni.2014.10.003
- Edwards AN, McBride SM (2014) Initiation of sporulation in *Clostridium difficile*: a twist on the classic model. *FEMS Microbiol Lett* 358:110–118. doi: 10.1111/1574-6968.12499
- El Feghaly RE, Stauber JL, Deych E, Gonzalez C, Tarr PI, Haslam DB (2013) Markers of intestinal inflammation, not bacterial burden, correlate with clinical outcomes in *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 56:1713–1721. doi: 10.1093/cid/cit147
- El Meouche I, Peltier J, Monot M, Soutourina O, Pestel-Caron M, Dupuy B, Pons J-L (2013) Characterization of the SigD Regulon of *C. difficile* and Its Positive Control of Toxin Production through the Regulation of tcdR. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0083748
- Emerson JE, Reynolds CB, Fagan RP, Shaw HA, Goulding D, Fairweather NF (2009) A novel genetic switch controls phase variable expression of CwpV, a *Clostridium difficile* cell wall protein. *Mol Microbiol* 74:541–556. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06812.x

- Enoch DA, Butler MJ, Pai S, Aliyu SH, Karas JA (2011) *Clostridium difficile* in children: colonisation and disease. *J Infect* 63:105–113. doi: 10.1016/j.jinf.2011.05.016
- Erhardt M, Namba K, Hughes KT (2010) Bacterial Nanomachines: The Flagellum and Type III Injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a000299
- Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Ip CLC, Golubchik T, Batty EM, Finney JM, Wyllie DH, Didelot X, Piazza P, Bowden R, Dingle KE, Harding RM, Crook DW, Wilcox MH, Peto TEA, Walker AS (2013) Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med* 369:1195–1205. doi: 10.1056/NEJMoa1216064
- Fagan RP, Albesa-Jové D, Qazi O, Svergun DI, Brown KA, Fairweather NF (2009) Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol* 71:1308–1322. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06603.x
- Fagan RP, Janoir C, Collignon A, Mastrantonio P, Poxton IR, Fairweather NF (2011) A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 60:1225–1228. doi: 10.1099/jmm.0.028472-0
- Faulds-Pain A, Twine SM, Vinogradov E, Strong PCR, Dell A, Buckley AM, Douce GR, Valiente E, Logan SM, Wren BW (2014) The post-translational modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence: *C. difficile* type A flagellin modification. *Mol Microbiol* 94:272–289. doi: 10.1111/mmi.12755
- Feng T, Cong Y, Alexander K, Elson CO (2012) Regulation of Toll-like Receptor 5 Gene Expression and Function on Mucosal Dendritic Cells. *PLOS ONE* 7:e35918. doi: 10.1371/journal.pone.0035918
- Flores-Langarica A, Marshall JL, Hitchcock J, Cook C, Jobanputra J, Bobat S, Ross EA, Coughlan RE, Henderson IR, Uematsu S, Akira S, Cunningham AF (2012) Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T cell and IgA responses in the mesenteric lymph node. *J Immunol Baltim Md* 190:5745–5754. doi: 10.4049/jimmunol.1202283
- Foster NF, Collins DA, Ditchburn SL, Duncan CN, van Schalkwyk JW, Golledge CL, Keed ABR, Riley TV (2014) Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in two tertiary-care hospitals in Perth, Western Australia: a cross-sectional study. *New Microbes New Infect* 2:64–71. doi: 10.1002/nmi2.43
- Fougeron D, Van Maele L, Songhet P, Cayet D, Hot D, Van Rooijen N, Mollenkopf H-J, Hardt W-D, Benecke AG, Sirard J-C (2015) Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine* 33:3331–3341. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.022
- Francis MB, Allen CA, Shrestha R, Sorg JA (2013) Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog* 9:e1003356. doi: 10.1371/journal.ppat.1003356
- Furci L, Baldan R, Bianchini V, Trovato A, Ossi C, Cichero P, Cirillo DM (2015) New role for human  $\alpha$ -defensin 5 in the fight against hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *Infect Immun* 83:986–995. doi: 10.1128/IAI.02955-14
- Galdys AL, Nelson JS, Shutt KA, Schlackman JL, Pakstis DL, Pasculle AW, Marsh JW, Harrison LH, Curry SR (2014) Prevalence and duration of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage among healthy subjects in Pittsburgh, Pennsylvania. *J Clin Microbiol* 52:2406–2409. doi: 10.1128/JCM.00222-14
- Ganeshapillai J, Vinogradov E, Rousseau J, Weese JS, Monteiro MA (2008) *Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units. *Carbohydr Res* 343:703–710. doi: 10.1016/j.carres.2008.01.002
- Gerding DN (2004) Clindamycin, Cephalosporins, Fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: This Is an Antimicrobial Resistance Problem. *Clin Infect Dis* 38:646–648. doi: 10.1086/382084

- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K (2014) *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 5:15–27. doi: 10.4161/gmic.26854
- Ghose C, Eugenis I, Edwards AN, Sun X, McBride SM, Ho DD (2016a) Immunogenicity and protective efficacy of *Clostridium difficile* spore proteins. *Anaerobe* 37:85–95. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.12.001
- Ghose C, Eugenis I, Sun X, Edwards AN, McBride SM, Pride DT, Kelly CP, Ho DD (2016b) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein FliC. *Emerg Microbes Infect* 5:e8. doi: 10.1038/emi.2016.8
- Giel JL, Sorg JA, Sonenshein AL, Zhu J (2010) Metabolism of bile salts in mice influences spore germination in *Clostridium difficile*. *PloS One* 5:e8740. doi: 10.1371/journal.pone.0008740
- Gieseemann T, Guttenberg G, Aktories K (2008) Human alpha-defensins inhibit *Clostridium difficile* toxin B. *Gastroenterology* 134:2049–2058. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.008
- Gilchrist JJ, MacLennan CA, Hill AVS (2015) Genetic susceptibility to invasive *Salmonella* disease. *Nat Rev Immunol* 15:452–463. doi: 10.1038/nri3858
- Girinathan BP, Braun SE, Govind R (2014) *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase is a secreted enzyme that confers resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Microbiol Read Engl* 160:47–55. doi: 10.1099/mic.0.071365-0
- Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Dekker FW, Kuijper EJ (2008) Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 47:1162–1170. doi: 10.1086/592257
- Goret J, Blanchi J, Eckert C, Lacombe S, Petit A, Barbut F, Bébéar C, Mégraud F (2015) Comparison of a novel chemiluminescent based algorithm to three algorithmic approaches for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Gut Pathog* 7:33. doi: 10.1186/s13099-015-0079-8
- Gupta A, Khanna S (2014) Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an increasing public health threat. *Infect Drug Resist* 7:63–72. doi: 10.2147/IDR.S46780
- Hall IC, O'Toole E (1935) Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. *Am J Dis Child* 49:390–402. doi: 10.1001/archpedi.1935.01970020105010
- Hasegawa M, Kamada N, Jiao Y, Liu MZ, Núñez G, Inohara N (2012) Protective role of Commensals against *Clostridium difficile* Infection via an IL-1 $\beta$ -Mediated Positive Feedback Loop. *J Immunol Baltim Md* 195 189:3085–3091. doi: 10.4049/jimmunol.1200821
- Hasegawa M, Yamazaki T, Kamada N, Tawaratsumida K, Kim Y-G, Núñez G, Inohara N (2011) Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. *J Immunol Baltim Md* 195 186:4872–4880. doi: 10.4049/jimmunol.1003761
- He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Connor TR, Harris SR, Fairley D, Bamford KB, D'Arc S, Brazier J, Brown D, Coia JE, Douce G, Gerding D, Kim HJ, Koh TH, Kato H, Senoh M, Louie T, Michell S, Butt E, Peacock SJ, Brown NM, Riley T, Songer G, Wilcox M, Pirmohamed M, Kuijper E, Hawkey P, Wren BW, Dougan G, Parkhill J, Lawley TD (2013) Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* 45:109–113. doi: 10.1038/ng.2478
- Hennequin C, Janoir C, Barc M-C, Collignon A, Karjalainen T (2003) Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiol Read Engl* 149:2779–2787.
- 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. *Microbiol Read Engl* 147:87–96.

- Hensbergen PJ, Klychnikov OI, Bakker D, Dragan I, Kelly ML, Minton NP, Corver J, Kuijper EJ, Drijfhout JW, van Leeuwen HC (2015) *Clostridium difficile* secreted Pro-Pro endopeptidase PPEP-1 (ZMP1/CD2830) modulates adhesion through cleavage of the collagen binding protein CD2831. *FEBS Lett* 589:3952–3958. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.027
- Hensbergen PJ, Klychnikov OI, Bakker D, van Winden VJC, Ras N, Kemp AC, Cordfunke RA, Dragan I, Deelder AM, Kuijper EJ, Corver J, Drijfhout JW, van Leeuwen HC (2014) A novel secreted metalloprotease (CD2830) from *Clostridium difficile* cleaves specific proline sequences in LPXTG cell surface proteins. *Mol Cell Proteomics MCP* 13:1231–1244. doi: 10.1074/mcp.M113.034728
- Ho JG, Greco A, Rupnik M, Ng KK-S (2005) Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18373–18378.
- Holmgren J, Czerkinsky C (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11:S45-53. doi: 10.1038/nm1213
- Islam J, Taylor AL, Rao K, Huffnagle G, Young VB, Rajkumar C, Cohen J, Papatheodorou P, Aronoff DM, Llewelyn MJ (2014) The role of the humoral immune response to *Clostridium difficile* toxins A and B in susceptibility to *C. difficile* infection: a case-control study. *Anaerobe* 27:82–86. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.03.011
- Jafari NV, Kuehne SA, Bryant CE, Elawad M, Wren BW, Minton NP, Allan E, Bajaj-Elliott M (2013) *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism(s). *PloS One* 8:e69846. doi: 10.1371/journal.pone.0069846
- Jank T, Aktories K (2008) Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol* 16:222–229. doi: 10.1016/j.tim.2008.01.011
- Janoir C (2016) Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* 37:13–24. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.009
- Janoir C, Denève C, Bouttier S, Barbut F, Hoys S, Caleechum L, Chapetón-Montes D, Pereira FC, Henriques AO, Collignon A, Monot M, Dupuy B (2013) Adaptive strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from in vivo transcriptomics. *Infect Immun* 81:3757–3769. doi: 10.1128/IAI.00515-13
- 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. doi: 10.1128/JB.00578-07
- Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG (2011) Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun* 79:1498–1503. doi: 10.1128/IAI.01196-10
- Jarchum I, Liu M, Shi C, Equinda M, Pamer EG (2012) Critical Role for MyD88-Mediated Neutrophil Recruitment during *Clostridium difficile* Colitis. *Infect Immun* 80:2989–2996. doi: 10.1128/IAI.00448-12
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK (2007) Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* 1:56–66. doi: 10.1038/ismej.2007.3
- Johal SS, Lambert CP, Hammond J, James PD, Borriello SP, Mahida YR (2004) Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Clin Pathol* 57:973–979. doi: 10.1136/jcp.2003.015875
- Johnson S, Gerding DN, Janoff EN (1992) Systemic and mucosal antibody responses to toxin A in patients infected with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 166:1287–1294.
- Johnson S, Sypura WD, Gerding DN, Ewing SL, Janoff EN (1995) Selective neutralization of a bacterial enterotoxin by serum immunoglobulin A in response to mucosal disease. *Infect Immun* 63:3166–3173.

- Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay T-L, Foss M, Lau PC, Sanders G, Austin J, Kelly J, Szymanski CM (2006) Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J Bacteriol* 188:4312–4320. doi: 10.1128/JB.01975-05
- Karjalainen T, Saumier N, Barc M-C, Delmee M, Collignon A (2002) *Clostridium difficile* Genotyping Based on slpA Variable Region in S-Layer Gene Sequence: an Alternative to Serotyping. *J Clin Microbiol* 40:2452–2458. doi: 10.1128/JCM.40.7.2452-2458.2002
- Katchar K, Taylor CP, Tummala S, Chen X, Sheikh J, Kelly CP (2007) Association between IgG2 and IgG3 subclass responses to toxin A and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 5:707–713. doi: 10.1016/j.cgh.2007.02.025
- Keessen EC, Harmanus C, Dohmen W, Lipman LJA (2013a) *Clostridium difficile* Infection Associated with Pig Farms. *Emerg Infect Dis* 19:1032–1034. doi: 10.3201/eid1906.121645
- Keessen EC, Hensgens MP, Spigaglia P, Barbanti F, Sanders IM, Kuijper EJ, Lipman LJ (2013b) Antimicrobial susceptibility profiles of human and piglet *Clostridium difficile* PCR-ribotype 078. *Antimicrob Resist Infect Control* 2:14. doi: 10.1186/2047-2994-2-14
- Kelly CP, Pothoulakis C, Orellana J, LaMont JT (1992) Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. *Gastroenterology* 102:35–40.
- Ketley JM, Haslam SC, Mitchell TJ, Stephen J, Candy DC, Burdon DW (1984) Production and release of toxins A and B by *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 18:385–391.
- Kim JM, Lee JY, Yoon YM, Oh Y-K, Youn J, Kim Y-J (2006) NF-kappa B activation pathway is essential for the chemokine expression in intestinal epithelial cells stimulated with *Clostridium difficile* toxin A. *Scand J Immunol* 63:453–460. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.001756.x
- Kim MN, Koh S-J, Kim JM, Im JP, Jung HC, Kim JS (2014) *Clostridium difficile* infection aggravates colitis in interleukin 10-deficient mice. *World J Gastroenterol* 20:17084–17091. doi: 10.3748/wjg.v20.i45.17084
- Kim S-H, Jang Y-S (2017) The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants. *Clin Exp Vaccine Res* 6:15–21. doi: 10.7774/cevr.2017.6.1.15
- Kim T-J, Young BM, Young GM (2008) Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 74:5466–5474. doi: 10.1128/AEM.00222-08
- Kirby JM, Ahern H, Roberts AK, Kumar V, Freeman Z, Acharya KR, Shone CC (2009) Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. *J Biol Chem* 284:34666–34673. doi: 10.1074/jbc.M109.051177
- Kirk JA, Banerji O, Fagan RP (2017a) Characteristics of the *Clostridium difficile* cell envelope and its importance in therapeutics. *Microb Biotechnol* 10:76–90. doi: 10.1111/1751-7915.12372
- Kirk JA, Gebhart D, Buckley AM, Lok S, Scholl D, Douce GR, Govoni GR, Fagan RP (2017b) New class of precision antimicrobials redefines role of *Clostridium difficile* S-layer in virulence and viability. *Sci Transl Med*. doi: 10.1126/scitranslmed.aah6813
- Knetsch CW, Connor TR, Mutreja A, van Dorp SM, Sanders IM, Browne HP, Harris D, Lipman L, Keessen EC, Corver J, Kuijper EJ, Lawley TD (2014) Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 19:20954.
- Koenigsnecht MJ, Theriot CM, Bergin IL, Schumacher CA, Schloss PD, Young VB (2015) Dynamics and Establishment of *Clostridium difficile* Infection in the Murine Gastrointestinal Tract. *Infect Immun* 83:934–941. doi: 10.1128/IAI.02768-14

- Kovacs-Simon A, Leuzzi R, Kasendra M, Minton N, Titball RW, Michell SL (2014) Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 210:274–284. doi: 10.1093/infdis/jiu070
- Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun* 79:548–561. doi: 10.1128/IAI.00682-10
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6:130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130
- Krishna A, Pervaiz A, Lephart P, Tarabishy N, Varakantam S, Kotecha A, Awali RA, Kaye KS, Chopra T (2017) Prevalence of *Clostridium difficile* infection in acute care hospitals, long-term care facilities, and outpatient clinics: Is *Clostridium difficile* infection underdiagnosed in long-term care facility patients? *Am J Infect Control*. doi: 10.1016/j.ajic.2017.04.288
- Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP (2010) The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 467:711–713. doi: 10.1038/nature09397
- Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP (2014) Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *J Infect Dis* 209:83–86. doi: 10.1093/infdis/jit426
- Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*, EU Member States, European Centre for Disease Prevention and Control (2006) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 12 Suppl 6:2–18. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2000) Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 342:390–397. doi: 10.1056/NEJM200002103420604
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2001) Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet Lond Engl* 357:189–193. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03592-3
- LaFrance ME, Farrow MA, Chandrasekaran R, Sheng J, Rubin DH, Lacy DB (2015) Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:7073–7078. doi: 10.1073/pnas.1500791112
- Lawley TD, Clare S, Walker AW, Goulding D, Stabler RA, Croucher N, Mastroeni P, Scott P, Raisen C, Mottram L, Fairweather NF, Wren BW, Parkhill J, Dougan G (2009) Antibiotic Treatment of *Clostridium difficile* Carrier Mice Triggers a Supershedder State, Spore-Mediated Transmission, and Severe Disease in Immunocompromised Hosts. *Infect Immun* 77:3661–3669. doi: 10.1128/IAI.00558-09
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM (2016) Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40:95–99. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008
- Le Monnier A, Duburcq A, Zahar J-R, Corvec S, Guillard T, Cattoir V, Woerther P-L, Fihman V, Lalande V, Jacquier H, Mizrahi A, Farfour E, Morand P, Marcadé G, Coulomb S, Torretton E, Fagnani F, Barbut F, GMC Study Group (2015) Hospital cost of *Clostridium difficile* infection including the contribution of recurrences in French acute-care hospitals. *J Hosp Infect* 91:117–122. doi: 10.1016/j.jhin.2015.06.017
- Lee BY, Popovich MJ, Tian Y, Bailey RR, Ufberg PJ, Wiringa AE, Muder RR (2010) The potential value of *Clostridium difficile* vaccine: An economic computer simulation model. *Vaccine* 28:5245–5253. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.05.062
- Lee JY, Kim H, Cha MY, Park HG, Kim Y-J, Kim IY, Kim JM (2009) *Clostridium difficile* toxin A promotes dendritic cell maturation and chemokine CXCL2 expression through p38, IKK, and the NF-kappaB signaling pathway. *J Mol Med Berl Ger* 87:169–180. doi: 10.1007/s00109-008-0415-2

- Lemée L, Bourgeois I, Ruffin E, Collignon A, Lemeland J-F, Pons J-L (2005) Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology* 151:3171–3180. doi: 10.1099/mic.0.28155-0
- Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JJ, Phipps EC, Wilson LE, Winston LG, Cohen JA, Limbago BM, Fridkin SK, Gerding DN, McDonald LC (2015) Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *N Engl J Med* 372:825–834. doi: 10.1056/NEJMoa1408913
- Leuzzi R, Spencer J, Buckley A, Brettoni C, Martinelli M, Tulli L, Marchi S, Luzzi E, Irvine J, Candlish D, Veggi D, Pansegrau W, Fiaschi L, Savino S, Swennen E, Cakici O, Oviedo-Orta E, Giraldi M, Baudner B, D’Urzo N, Maione D, Soriani M, Rappuoli R, Pizza M, Douce GR, Scarselli M (2013) Protective efficacy induced by recombinant *Clostridium difficile* toxin fragments. *Infect Immun* 81:2851–2860. doi: 10.1128/IAI.01341-12
- Libby JM, Wilkins TD (1982) Production of antitoxins to two toxins of *Clostridium difficile* and immunological comparison of the toxins by cross-neutralization studies. *Infect Immun* 35:374–376.
- Liu R, Ochman H (2007) Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7116–7121. doi: 10.1073/pnas.0700266104
- Loo VG (2005) A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 353:2442–2449. doi: 10.1056/NEJMoa051639
- Luo R, Greenberg A, Stone CD (2015) Outcomes of *Clostridium difficile* infection in hospitalized leukemia patients: a nationwide analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36:794–801. doi: 10.1017/ice.2015.54
- Lynch M, Walsh TA, Marszalowska I, Webb AE, MacAogain M, Rogers TR, Windle H, Kelleher D, O’Connell MJ, Loscher CE (2017) Surface layer proteins from virulent *Clostridium difficile* ribotypes exhibit signatures of positive selection with consequences for innate immune response. *BMC Evol Biol* 17:90. doi: 10.1186/s12862-017-0937-8
- Lyra A, Forssten S, Rolny P, Wettergren Y, Lahtinen SJ, Salli K, Cedgård L, Odin E, Gustavsson B, Ouwehand AC (2012) Comparison of bacterial quantities in left and right colon biopsies and faeces. *World J Gastroenterol WJG* 18:4404–4411. doi: 10.3748/wjg.v18.i32.4404
- Lyras D, O’Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN, Rood JI (2009) Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458:1176–1179. doi: 10.1038/nature07822
- Ma GK, Brensinger CM, Wu Q, Lewis JD (2017) Increasing Incidence of Multiply Recurrent *Clostridium difficile* Infection in the United States: A Cohort Study. *Ann Intern Med*. doi: 10.7326/M16-2733
- Madhun AS, Haaheim LR, Nøstbakken JK, Ebensen T, Chichester J, Yusibov V, Guzman CA, Cox RJ (2011) Intranasal c-di-GMP-adjuvanted plant-derived H5 influenza vaccine induces multifunctional Th1 CD4+ cells and strong mucosal and systemic antibody responses in mice. *Vaccine* 29:4973–4982. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.094
- Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK, Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team (2014) Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 370:1198–1208. doi: 10.1056/NEJMoa1306801
- Martin-Verstraete I, Peltier J, Dupuy B (2016) The Regulatory Networks That Control *Clostridium difficile* Toxin Synthesis. *Toxins*. doi: 10.3390/toxins8050153
- McDermott AJ, Falkowski NR, McDonald RA, Pandit CR, Young VB, Huffnagle GB (2016) Interleukin-23 (IL-23), independent of IL-17 and IL-22, drives neutrophil recruitment and innate inflammation during *Clostridium difficile* colitis in mice. *Immunology* 147:114–124. doi: 10.1111/imm.12545

- McDermott AJ, Frank CR, Falkowski NR, McDonald RA, Young VB, Huffnagle GB (2014) Role of GM-CSF in the inflammatory cytokine network that regulates neutrophil influx into the colonic mucosa during *Clostridium difficile* infection in mice. *Gut Microbes* 5:476–484. doi: 10.4161/gmic.29964
- McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, Song X, Horan T, Kutty PK, Ad Hoc *Clostridium difficile* Surveillance Working Group (2007) Recommendations for surveillance of *Clostridium difficile*-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:140–145. doi: 10.1086/511798
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 353:2433–2441. doi: 10.1056/NEJMoa051590
- McDonald LC, Owings M, Jernigan DB (2006) *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. *Emerg Infect Dis* 12:409–415. doi: 10.3201/eid1205.051064
- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 320:204–210. doi: 10.1056/NEJM198901263200402
- Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD (2003) The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 170:5165–5175.
- Merrigan MM, Venugopal A, Roxas JL, Anwar F, Mallozzi MJ, Roxas BAP, Gerding DN, Viswanathan VK, Vedantam G (2013) Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS One* 8:e78404. doi: 10.1371/journal.pone.0078404
- Messner P, Sleytr UB (1992) Crystalline bacterial cell-surface layers. *Adv Microb Physiol* 33:213–275.
- Meyer GKA, Neetz A, Brandes G, Tsikas D, Butterfield JH, Just I, Gerhard R (2007) *Clostridium difficile* toxins A and B directly stimulate human mast cells. *Infect Immun* 75:3868–3876. doi: 10.1128/IAI.00195-07
- Mizel SB, Bates JT (2010) Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol Baltim Md* 1950 185:5677–5682. doi: 10.4049/jimmunol.1002156
- Monot M, Eckert C, Lemire A, Hamiot A, Dubois T, Tessier C, Dumoulard B, Hamel B, Petit A, Lalande V, Ma L, Bouchier C, Barbut F, Dupuy B (2015) *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep15023
- Moon P, Foster NF, Hampson DJ, Knight DR, Bloomfield LE, Riley TV (2016) *Clostridium difficile* Infection in Production Animals and Avian Species: A Review. *Foodborne Pathog Dis* 13:647–655. doi: 10.1089/fpd.2016.2181
- Mowat AM, Agace WW (2014) Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14:667–685. doi: 10.1038/nri3738
- Mulligan ME, Miller SD, McFarland LV, Fung HC, Kwok RY (1993) Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 16 Suppl 4:S239-244.
- Muñoz P, Giannella M, Alcalá L, Sarmiento E, Fernandez Yañez J, Palomo J, Catalán P, Carbone J, Bouza E (2007) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in heart transplant recipients: is hypogammaglobulinemia the answer? *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 26:907–914. doi: 10.1016/j.healun.2007.07.010
- Na X, Kim H, Moyer MP, Pothoulakis C, LaMont JT (2008) gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 76:2862–2871. doi: 10.1128/IAI.00326-08
- Ng J, Hirota SA, Gross O, Li Y, Ulke-Lemee A, Potentier MS, Schenck LP, Vilaysane A, Seamone ME, Feng H, Armstrong GD, Tschopp J, Macdonald JA, Muruve DA, Beck PL (2010) *Clostridium difficile* toxin-



- induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology* 139:542–552, 552.e1–3. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.005
- Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA (2001) *Clostridium difficile* Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins. *Infect Immun* 69:1329–1336. doi: 10.1128/IAI.69.3.1329-1336.2001
- Origüen J, Fernández-Ruiz M, Lumbreras C, Orellana MÁ, López-Medrano F, Ruiz-Merlo T, San Juan R, García-Reyne A, González E, Polanco N, Paz-Artal E, Andrés A, Aguado JM (2015) Potential role of post-transplant hypogammaglobulinemia in the risk of *Clostridium difficile* infection after kidney transplantation: a case-control study. *Infection* 43:413–422. doi: 10.1007/s15010-015-0737-2
- Orrhage K, Brismar B, Nord CE (1994) Effect of Supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the Intestinal Microbiota during Administration of Clindamycin. *Microb Ecol Health Dis* 7:17–25. doi: 10.3109/08910609409141570
- Owens RC, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA (2008) Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 46 Suppl 1:S19-31. doi: 10.1086/521859
- Pantosti A, Cerquetti M, Viti F, Ortisi G, Mastrantonio P (1989) Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 27:2594–2597.
- Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp TR, Aktories K (2011) Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16422–16427. doi: 10.1073/pnas.1109772108
- Paredes-Sabja D, Cofre-Araneda G, Brito-Silva C, Pizarro-Guajardo M, Sarker MR (2012) *Clostridium difficile* Spore-Macrophage Interactions: Spore Survival. *PLoS ONE* 7:e43635. doi: 10.1371/journal.pone.0043635
- Paredes-Sabja D, Sarker MR (2012) Adherence of *Clostridium difficile* spores to Caco-2 cells in culture. *J Med Microbiol* 61:1208–1218. doi: 10.1099/jmm.0.043687-0
- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA (2014) *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol* 22:406–416. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.003
- Péchiné S, Collignon A (2016) Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 41:68–78. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.04.014
- Péchiné S, Denève C, Le Monnier A, Hoys S, Janoir C, Collignon A (2011) Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63:73–81. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00832.x
- Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, Collignon A (2005) Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 54:193–196.
- Péchiné S, Hennequin C, Boursier C, Hoys S, Collignon A (2013) Immunization using GroEL decreases *Clostridium difficile* intestinal colonization. *PloS One* 8:e81112. doi: 10.1371/journal.pone.0081112
- Péchiné S, Janoir C, Boureau H, Gleizes A, Tsapis N, Hoys S, Fattal E, Collignon A (2007) Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. *Vaccine* 25:3946–3954. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.055
- Pépin J, Valiquette L, Alary M-E, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pépin K, Chouinard D (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can* 171:466–472. doi: 10.1503/cmaj.1041104

- Pépin J, Valiquette L, Cossette B (2005) Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can* 173:1037–1042. doi: 10.1503/cmaj.050978
- Percy MG, Gründling A (2014) Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 68:81–100. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-112949
- Phetcharaburanin J, Hong HA, Colenutt C, Bianconi I, Sempere L, Permpoonpattana P, Smith K, Dembek M, Tan S, Brisson M-C, Brisson AR, Fairweather NF, Cutting SM (2014) The spore-associated protein BclA1 affects the susceptibility of animals to colonization and infection by *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol* 92:1025–1038. doi: 10.1111/mmi.12611
- Plaza-Garrido Á, Barra-Carrasco J, Macias JH, Carman R, Fawley WN, Wilcox MH, Hernández-Rocha C, Guzmán-Durán AM, Alvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D (2016) Predominance of *Clostridium difficile* ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, 2012. *Epidemiol Infect* 144:976–979. doi: 10.1017/S0950268815002459
- Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 56:2299–2306.
- Qian F, Yin J, Li M, Guo A, Li T, Zhou L, Wu X, Xu H (2016) Intranasal immunization with a peptide conjugated to *Salmonella* flagellin induces both systemic and mucosal peptide-specific antibody responses in mice. *Microbiol Immunol* 60:497–500. doi: 10.1111/1348-0421.12396
- Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 12:509–517. doi: 10.1016/j.tim.2004.09.002
- Rea MC, O’Sullivan O, Shanahan F, O’Toole PW, Stanton C, Ross RP, Hill C (2012) *Clostridium difficile* Carriage in Elderly Subjects and Associated Changes in the Intestinal Microbiota. *J Clin Microbiol* 50:867–875. doi: 10.1128/JCM.05176-11
- Reid CW, Vinogradov E, Li J, Jarrell HC, Logan SM, Brisson J-R (2012) Structural characterization of surface glycans from *Clostridium difficile*. *Carbohydr Res* 354:65–73. doi: 10.1016/j.carres.2012.02.002
- Reynolds CB, Emerson JE, de la Riva L, Fagan RP, Fairweather NF (2011) The *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV is antigenically variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function. *PLoS Pathog* 7:e1002024. doi: 10.1371/journal.ppat.1002024
- Rocha MF, Soares AM, Flores CA, Steiner TS, Lyerly DM, Guerrant RL, Ribeiro RA, Lima AA (1998) Intestinal secretory factor released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1beta. *Infect Immun* 66:4910–4916.
- Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delmée M, Daube G (2016) *Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review. *Adv Exp Med Biol* 932:65–92. doi: 10.1007/5584\_2016\_27
- Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault A-C, Le Monnier A, Collignon A (2012) *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 55:1209–1215. doi: 10.1093/cid/cis637
- Rumbo M, Nempont C, Kraehenbuhl J-P, Sirard J-C (2006) Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: Lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett* 580:2976–2984. doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.036
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009) *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7:526–536. doi: 10.1038/nrmicro2164
- Ryan A, Lynch M, Smith SM, Amu S, Nel HJ, McCoy CE, Dowling JK, Draper E, O’Reilly V, McCarthy C, O’Brien J, Ní Eidhin D, O’Connell MJ, Keogh B, Morton CO, Rogers TR, Fallon PG, O’Neill LA, Kelleher D, Loscher CE (2011) A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. *PLoS Pathog* 7:e1002076. doi: 10.1371/journal.ppat.1002076

- Sadighi Akha AA, Theriot CM, Erb-Downward JR, McDermott AJ, Falkowski NR, Tyra HM, Rutkowski DT, Young VB, Huffnagle GB (2013) Acute infection of mice with *Clostridium difficile* leads to eIF2 $\alpha$  phosphorylation and pro-survival signalling as part of the mucosal inflammatory response. *Immunology* 140:111–122. doi: 10.1111/imm.12122
- Sandolo C, Péchiné S, Le Monnier A, Hoys S, Janoir C, Coviello T, Alhaique F, Collignon A, Fattal E, Tsapis N (2011) Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*. *Eur J Pharm Biopharm* 79:566–573. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.05.011
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184:1140–1154.
- Saujet L, Monot M, Dupuy B, Soutourina O, Martin-Verstraete I (2011) The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 193:3186–3196. doi: 10.1128/JB.00272-11
- Savariau-Lacomme MP, Lebarbier C, Karjalainen T, Collignon A, Janoir C (2003) Transcription and analysis of polymorphism in a cluster of genes encoding surface-associated proteins of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 185:4461–4470. doi: 10.1128/JB.185.15.4461-4470.2003
- Scaria J, Janvilisri T, Fubini S, Gleed RD, McDonough SP, Chang Y-F (2011) *Clostridium difficile* transcriptome analysis using pig ligated loop model reveals modulation of pathways not modulated in vitro. *J Infect Dis* 203:1613–1620. doi: 10.1093/infdis/jir112
- Schwan C, Kruppke AS, Nölke T, Schumacher L, Koch-Nolte F, Kudryashev M, Stahlberg H, Aktories K (2014) *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2313–2318. doi: 10.1073/pnas.1311589111
- Seto CT, Jeraldo P, Orenstein R, Chia N, DiBaise JK (2014) Prolonged use of a proton pump inhibitor reduces microbial diversity: implications for *Clostridium difficile* susceptibility. *Microbiome* 2:42. doi: 10.1186/2049-2618-2-42
- Seugendo M, Mshana SE, Hokororo A, Okamo B, Mirambo MM, von Müller L, Gunka K, Zimmermann O, Groß U (2015) *Clostridium difficile* infections among adults and children in Mwanza/Tanzania: is it an underappreciated pathogen among immunocompromised patients in sub-Saharan Africa? *New Microbes New Infect* 8:99–102. doi: 10.1016/j.nmni.2015.09.016
- Shields K, Araujo-Castillo RV, Theethira TG, Alonso CD, Kelly CP (2015) Recurrent *Clostridium difficile* infection: From colonization to cure. *Anaerobe* 34:59–73. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.012
- Shirvan AN, Aitken R (2016) Isolation of recombinant antibodies directed against surface proteins of *Clostridium difficile*. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol* 47:394–402. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.017
- Smith A (2005) Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypotoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 10:E050630.2.
- Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SLR, Cookson BT, Aderem A (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4:1247–1253. doi: 10.1038/ni1011
- Smith LD, King EO (1962) Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. *J Bacteriol* 84:65–67.
- Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ (2016) *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primer* 2:16020. doi: 10.1038/nrdp.2016.20
- Sorg JA, Sonenshein AL (2009) Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol* 191:1115–1117. doi: 10.1128/JB.01260-08

- Sorg JA, Sonenshein AL (2010) Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogs of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *J Bacteriol* 192:4983–4990. doi: 10.1128/JB.00610-10
- Sorg JA, Sonenshein AL (2008) Bile Salts and Glycine as Cogerminants for *Clostridium difficile* Spores. *J Bacteriol* 190:2505–2512. doi: 10.1128/JB.01765-07
- Soutourina OA, Bertin PN (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 27:505–523.
- Soutourina OA, Monot M, Boudry P, Saujet L, Pichon C, Sismeiro O, Semenova E, Severinov K, Le Bouguenec C, Coppée J-Y, Dupuy B, Martin-Verstraete I (2013) Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet* 9:e1003493. doi: 10.1371/journal.pgen.1003493
- Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, Brazier JS, Barbut F, Delmée M, Kuijper E, Poxton IR, European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD) (2008) Fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile* isolates from a prospective study of *C. difficile* infections in Europe. *J Med Microbiol* 57:784–789. doi: 10.1099/jmm.0.47738-0
- Spigaglia P, Galeotti CL, Barbanti F, Scarselli M, Van Broeck J, Mastrantonio P (2011) The LMW surface-layer proteins of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 share common immunogenic properties. *J Med Microbiol* 60:1168–1173. doi: 10.1099/jmm.0.029710-0
- Squire MM, Carter GP, Mackin KE, Chakravorty A, Norén T, Elliott B, Lyras D, Riley TV (2013) Novel molecular type of *Clostridium difficile* in neonatal pigs, Western Australia. *Emerg Infect Dis* 19:790–792. doi: 10.3201/eid1905.121062
- Stratmann T (2015) Cholera toxin subunit B as adjuvant: an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity. *Vaccines* 3:579–596. doi: 10.3390/vaccines3030579
- Sullivan A, Edlund C, Nord CE (2001) Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis* 1:101–114. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00066-4
- Tao L, Zhang J, Meraner P, Tovaglieri A, Wu X, Gerhard R, Zhang X, Stallcup WB, Miao J, He X, Hurdle JG, Breault DT, Brass AL, Dong M (2016) Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. *Nature* 538:350–355. doi: 10.1038/nature19799
- Tasteyre A, Barc MC, 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. doi: 10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001
- Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, Barc MC (2000) Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (fliC) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol* 38:3179–3186.
- Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH (1974) Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med* 81:429–433.
- Theriot CM, Bowman AA, Young VB (2016) Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere*. doi: 10.1128/mSphere.00045-15
- Tickler IA, Goering RV, Whitmore JD, Lynn ANW, Persing DH, Tenover FC, Healthcare Associated Infection Consortium (2014) Strain types and antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* isolates from the United States, 2011 to 2013. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4214–4218. doi: 10.1128/AAC.02775-13
- Tulli L, Marchi S, Petracca R, Shaw HA, Fairweather NF, Scarselli M, Soriani M, Leuzzi R (2013) CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen: Collagen binding protein of *Clostridium difficile*. *Cell Microbiol* n/a-n/a. doi: 10.1111/cmi.12139

- Twine SM, Reid CW, Aubry A, McMullin DR, Fulton KM, Austin J, Logan SM (2009) Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 191:7050–7062. doi: 10.1128/JB.00861-09
- Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang B-G, Jung Y-J, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S (2008) Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9:769–776. doi: 10.1038/ni.1622
- Underwood S, Guan S, Vijayasubhash V, Baines SD, Graham L, Lewis RJ, Wilcox MH, Stephenson K (2009) Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *J Bacteriol* 191:7296–7305. doi: 10.1128/JB.00882-09
- van Dorp SM, Kinross P, Gastmeier P, Behnke M, Kola A, Delmée M, Pavelkovich A, Mentula S, Barbut F, Hajdu A, Ingøbretsen A, Pituch H, Macovei IS, Jovanović M, Wiuff C, Schmid D, Olsen KE, Wilcox MH, Suetens C, Kuijper EJ, European *Clostridium difficile* Infection Surveillance Network (ECDIS-Net) on behalf of all participants (2016) Standardised surveillance of *Clostridium difficile* infection in European acute care hospitals: a pilot study, 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30293
- van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JFWM, Tijssen JGP, Speelman P, Dijkgraaf MGW, Keller JJ (2013) Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 368:407–415. doi: 10.1056/NEJMoa1205037
- Vincent C, Manges AR (2015) Antimicrobial Use, Human Gut Microbiota and *Clostridium difficile* Colonization and Infection. *Antibiotics* 4:230–253. doi: 10.3390/antibiotics4030230
- Vindigni SM, Surawicz CM (2017) Fecal Microbiota Transplantation. *Gastroenterol Clin North Am* 46:171–185. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.012
- Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder RW, Bartlett JG (1983) Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 148:93–100.
- Vohra P, Poxton IR (2012) Induction of cytokines in a macrophage cell line by proteins of *Clostridium difficile*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:96–104. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00952.x
- Vonberg R-P, Kuijper EJ, Wilcox MH, Barbut F, Tüll P, Gastmeier P, European C difficile-Infection Control Group, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), van den Broek PJ, Colville A, Coignard B, Daha T, Debast S, Duerden BI, van den Hof S, van der Kooi T, Maarleveld HJH, Nagy E, Notermans DW, O'Driscoll J, Patel B, Stone S, Wiuff C (2008) Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 14 Suppl 5:2–20. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.01992.x
- Voth DE, Ballard JD (2005) *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18:247–263. doi: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005
- Waligora AJ, 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. doi: 10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001
- Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, Qamar A, Pothoulakis C, LaMont JT, Kelly CP (2000) p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 105:1147–1156. doi: 10.1172/JCI7545
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet Lond Engl* 366:1079–1084. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67420-X
- Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmée M (1994) Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun* 62:384–389.

- Warriner K, Xu C, Habash M, Sultan S, Weese SJ (2017) Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection? *J Appl Microbiol* 122:542–553. doi: 10.1111/jam.13338
- Waslawski S, Lo ES, Ewing SA, Young VB, Aronoff DM, Sharp SE, Novak-Weekley SM, Crist AE, Dunne WM, Hoppe-Bauer J, Johnson M, Brecher SM, Newton DW, Walk ST (2013) *Clostridium difficile* ribotype diversity at six health care institutions in the United States. *J Clin Microbiol* 51:1938–1941. doi: 10.1128/JCM.00056-13
- Weber DJ, Anderson D, Rutala WA (2013) The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis* 26:338–344. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283630f04
- Wendt JM, Cohen JA, Mu Y, Dumyati GK, Dunn JR, Holzbauer SM, Winston LG, Johnston HL, Meek JI, Farley MM, Wilson LE, Phipps EC, Beldavs ZG, Gerding DN, McDonald LC, Gould CV, Lessa FC (2014) *Clostridium difficile* infection among children across diverse US geographic locations. *Pediatrics* 133:651–658. doi: 10.1542/peds.2013-3049
- Wershil BK, Castagliuolo I, Pothoulakis C (1998) Direct evidence of mast cell involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology* 114:956–964.
- Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, Stephens J, Shelbaya A, Haider S (2012) Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. *J Hosp Infect* 81:1–14. doi: 10.1016/j.jhin.2012.02.004
- Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, Cornely OA, Rahav G, Bouza E, Lee C, Jenkin G, Jensen W, Kim Y-S, Yoshida J, Gabryelski L, Pedley A, Eves K, Tipping R, Guris D, Kartsonis N, Dorr M-B, MODIFY I and MODIFY II Investigators (2017) Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* 376:305–317. doi: 10.1056/NEJMoa1602615
- Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN (2008) A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 62:388–396. doi: 10.1093/jac/dkn163
- Willing SE, Candela T, Shaw HA, Seager Z, Mesnage S, Fagan RP, Fairweather NF (2015) *Clostridium difficile* surface proteins are anchored to the cell wall using CWB2 motifs that recognise the anionic polymer PSII: *C. difficile* cell wall protein anchoring. *Mol Microbiol* 96:596–608. doi: 10.1111/mmi.12958
- Wilson KH (1983) Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *J Clin Microbiol* 18:1017–1019.
- Winstanley C, Morgan JAW (1997) The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology* 143:3071–3084. doi: 10.1099/00221287-143-10-3071
- Wright A, Drudy D, Kyne L, Brown K, Fairweather NF (2008) Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *J Med Microbiol* 57:750–756. doi: 10.1099/jmm.0.47532-0
- Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, Gong Y-N, Peng X, Xi JJ, Chen S, Wang F, Shao F (2014) Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pysin inflammasome. *Nature* 513:237–241. doi: 10.1038/nature13449
- Yaeger M, Funk N, Hoffman L (2002) A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* 14:281–287. doi: 10.1177/104063870201400402
- Yildiz FH, Visick KL (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol* 17:109–118. doi: 10.1016/j.tim.2008.12.004
- Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, Ota Y (2013) *Clostridium difficile* flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sci* 92:211–217. doi: 10.1016/j.lfs.2012.11.017

- Young VB, Schmidt TM (2004) Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *J Clin Microbiol* 42:1203–1206.
- Yuan P, Zhang H, Cai C, Zhu S, Zhou Y, Yang X, He R, Li C, Guo S, Li S, Huang T, Perez-Cordon G, Feng H, Wei W (2015) Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell Res* 25:157–168. doi: 10.1038/cr.2014.169
- Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Grigoras C, Pliakos EE, Mylonakis E (2015) Asymptomatic carriers of toxigenic *C. difficile* in long-term care facilities: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *PLoS One* 10:e0117195. doi: 10.1371/journal.pone.0117195
- Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report | HAI | CDC.  
<https://www.cdc.gov/hai/surveillance/progress-report/index.html>. Accessed 27 Jul 2017
- (2015) Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention [online]. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.

# **Annexe**



## Participation à des congrès internationaux : posters

5<sup>th</sup> International *Clostridium difficile* Symposium (ICDS), 2015, Bled, Slovenia

TITLE: Immunogenic properties of the surface layer protein (SlpA) of *Clostridium difficile* and immunization assays in animal models

Authors: *J-F. Bruxelles, A. Mizrahi Chalom, S. Hoys, A. Collignon and S. Péchiné.*

10th Vaccine congress, 2016, Amsterdam, Netherland

TITLE: Interest of flagellin FliC in mucosal vaccination against *Clostridium difficile*

Authors : *J-F. Bruxelles, A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné.*

16th Euro Global Summit and Expo on Vaccines and Vaccination, 2017, Paris, France

TITLE: *Clostridium difficile* flagellin FliC as adjuvant to induce a protective gut mucosal immune response

Authors: *J-F. Bruxelles, A. Mizrahi, A. Collignon, Claire Janoir, Séverine Péchiné*

10th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia (CLOSTPATH), 2017, Ann Arbor, Michigan, USA

TITLE: The lipoprotein CD0873: a *Clostridium difficile* colonization factor

Authors: J-F. Bruxelles, SL. Michell, A. Kovacs-Simon, S. Hoys, C. Janoir, S. Péchiné

# Immunogenic properties of the surface layer protein (SlpA) of *Clostridium difficile* and immunization assays in hamsters and mice.

J-F. Bruxelles and A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné,  
EA 4043 "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, France.

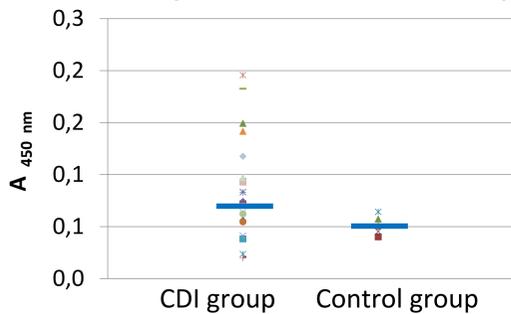
## Introduction

*Clostridium difficile* is an opportunistic pathogen causing gut inflammation often due to a dysbiosis associated with antibiotics. Several virulence factors have been identified to play a key role in adhesion and gut colonization. The most abundant proteins on *C. difficile* surface are the two surface layer proteins: the high molecular weight S-layer protein (HMW-SLP) and the low molecular weight S-layer protein (LMW-SLP). These two subunits are derived via Cwp84-mediated cleavage of a single precursor protein SlpA.

**Aim of this study:** to assess the immunogenic properties of a recombinant SlpA precursor derived from a toxigenic strain of *C. difficile* and to test its protective effect as a vaccine antigen combined with Cholera toxin adjuvant in both hamsters and mice.

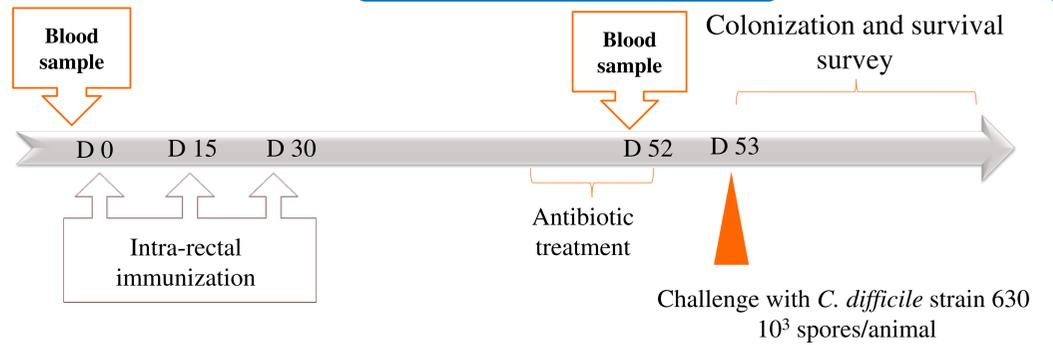
## SlpA precursor immunogenicity

### Antibody levels against SlpA precursor in sera from CDI patients and from control patients



Higher antibody level in *Clostridium difficile* infected patients group (CDI) compare to control patient group.

## Immunization method



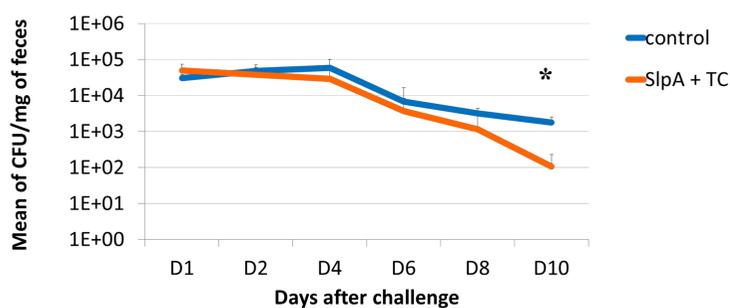
After three intra-rectal immunizations with SlpA precursor combined to Cholera toxin adjuvant, hamsters and mice received antibiotics to disrupt gut barrier function. Then, animals were challenged with spores of toxigenic *C. difficile* strain 630:

- Post challenge survival was observed
- Intestinal colonization was followed by fecal bacterial count
- SlpA antibody levels were evaluated in animals' sera by ELISA

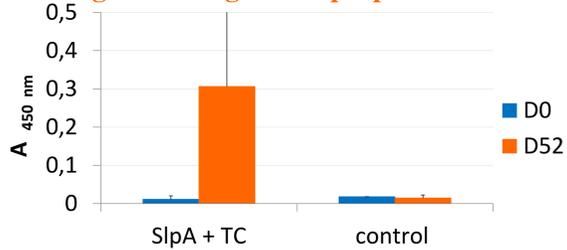
## Immunization results

### mouse model

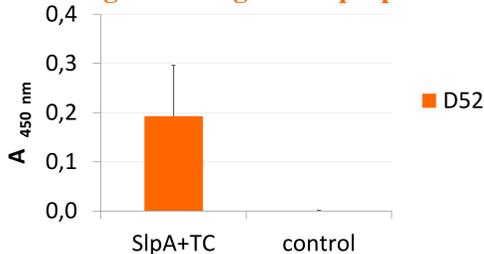
#### Intestinal *C. difficile* colonization after challenge



#### IgG levels against SlpA precursor



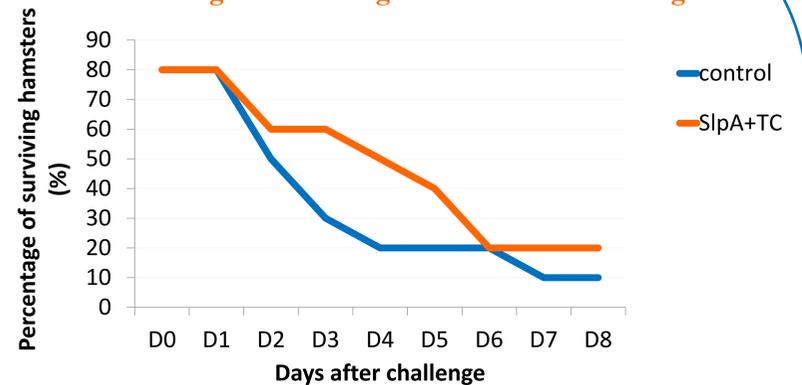
#### IgA levels against SlpA precursor



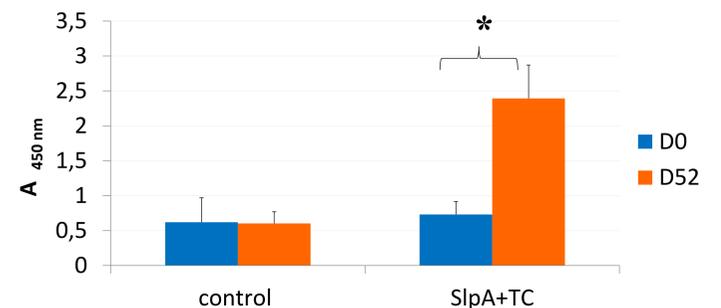
- Intra-rectal administration of SlpA precursor induced production of specific IgG and IgA
- Immunized mice were significantly less colonized than control mice 10 days after challenge

### hamster model

#### Percentage of surviving hamsters after challenge



#### Antibody levels against SlpA precursor



Specific SlpA precursor antibodies in hamsters conferred a partial but not lasting protection against CDI

## Conclusion

Patients with CDI have significantly higher SlpA precursor antibodies than patients in control group, confirming the expression of this protein during the pathogenic process. Intra-rectal immunizations with SlpA precursor induce a local and systemic humoral response in mice and hamsters, potentially responsible for the decrease of *C. difficile* colonization in mice and the partial protection observed in a lethal-hamster model. To improve these preliminary results, the SlpA precursor vaccine candidate could be combined to other surface associated proteins.

J-F. Bruxelles, A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné,

EA 4043 "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France.

## Introduction

*Clostridium difficile* is an opportunistic pathogen causing gut inflammation often due to a dysbiosis associated with antibiotics. Several virulence factors have been identified to play a key role in host-pathogen interactions. Flagellin immunogenicity has been reported and thanks to its close interaction with the immune system through the innate and adaptive immunity, flagellin can be tested as a vaccine candidate or as adjuvant.

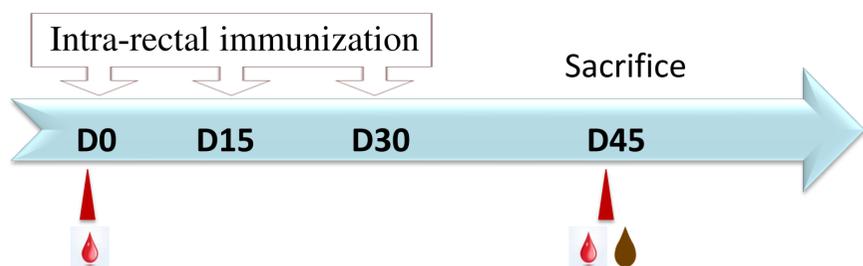
**Aim of this study** : Here we assessed the interest of flagellin (FliC) of *C. difficile* as a mucosal adjuvant compared to the flagellin of *Salmonella Typhimurium* (FIA-ST) and cholera toxin (CT), first with ovalbumin as antigen and second with a *C. difficile* surface protein (SlpA).

## Methods and Results

- 4 groups of 6 C57BL/6 mice intrarectally immunized with ovalbumin (OVA) as antigen:
  - OVA (20 µg) + PBS
  - OVA (20 µg) + cholera toxin (CT) (7 µg)
  - OVA (20 µg) + *S. typhimurium* flagellin FIA-ST (invivogen) (7 µg)
  - OVA (20 µg) + *C. difficile* recombinant FliC (7 µg)

• Day 0: Blood sample

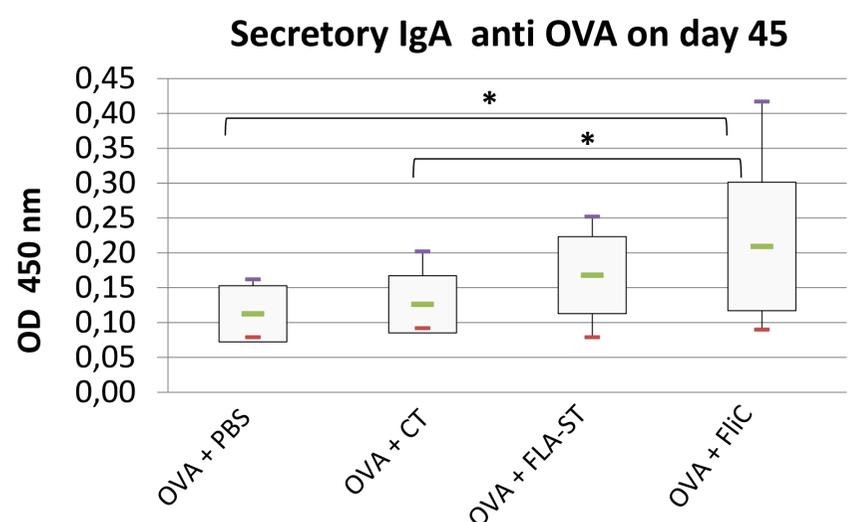
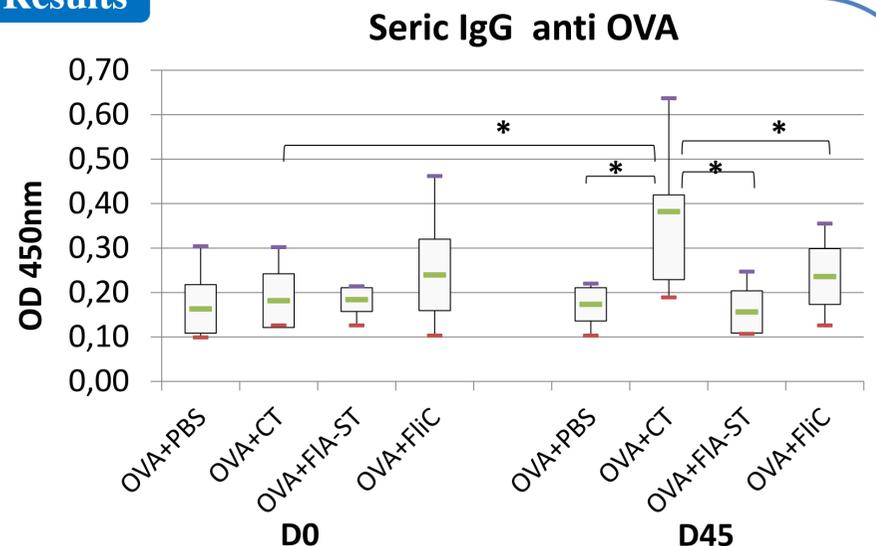
• Day 45: Blood and caecal content sample



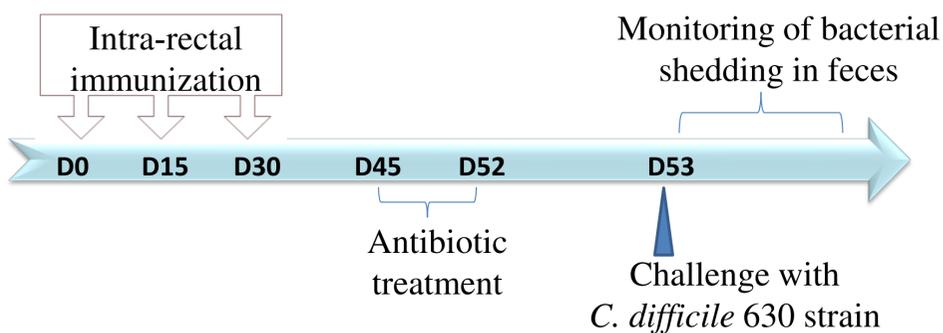
✓ Immunization with OVA and CT as adjuvant induce a higher production of IgGs than with OVA and FliC ( $p=0.041$ ) and OVA only ( $p<0.001$ ).

✓ Immunization with OVA and FliC as adjuvant induce a higher production of secretory IgA than with OVA and CT ( $p=0.030$ ) and OVA only ( $p=0.015$ ).

➤ FliC as adjuvant in immunization via the rectal route is susceptible to stimulate a mucosal immune response.

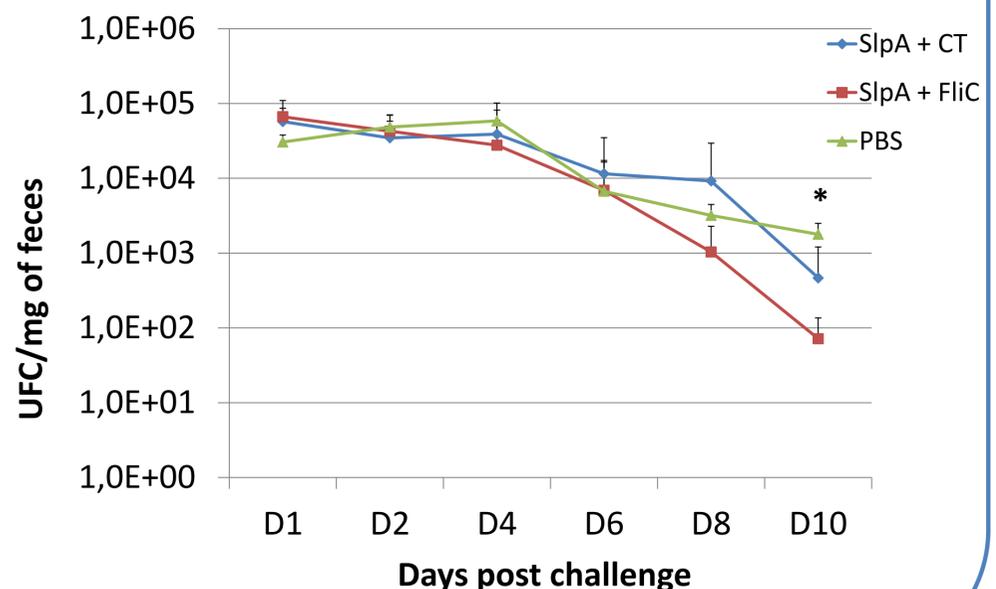


- 3 groups of 6 C57BL/6 mice intrarectally immunized with S-layer protein A of *C. difficile* (SlpA) as antigen:
  - SlpA (50 µg) + cholera toxin (CT) (7 µg)
  - SlpA (50 µg) + *C. difficile* recombinant FliC (7 µg)
  - PBS only



✓ On day 10: Significant decrease of *C. difficile* intestinal colonization for mice immunized with SlpA and FliC as adjuvant compared to control ( $p<0.05$ ).

## Mean of CFU/mg of feces from immunized mice



## Conclusion

Intra-rectal immunizations of mice with CT as adjuvant induce a higher systemic IgG response than flagellin, whereas flagellin-adjuvanted immunizations induce a stronger local sIgA response than CT and with a significantly higher level with FliC. In addition, when FliC is associated with SlpA in a mucosal vaccination assay, we have observed a promising decrease of *C. difficile* intestinal colonization. Therefore our results showed that FliC could be used as an adjuvant for further investigation in mucosal vaccination strategy against *C. difficile* infections.

J-F. Bruxelles, A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné,

EA 4043 "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France.

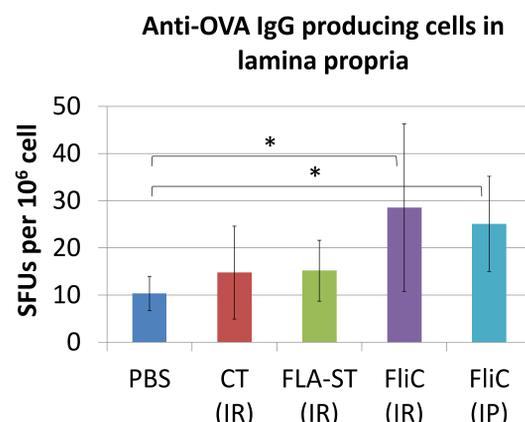
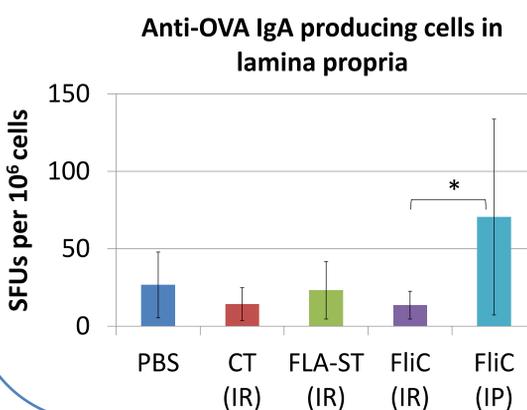
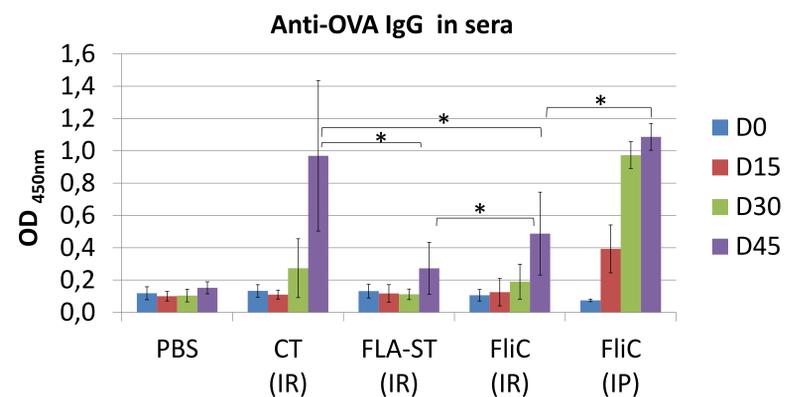
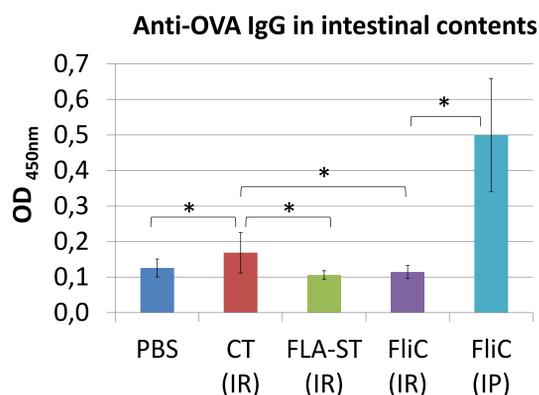
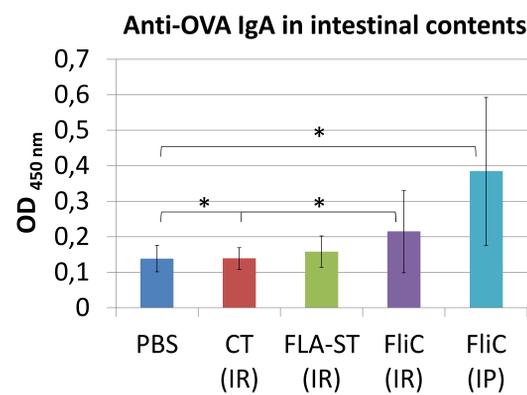
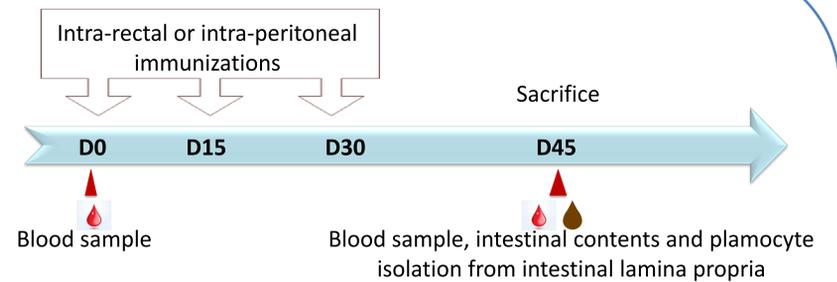
## Introduction

*Clostridium difficile* is an opportunistic pathogen causing gut inflammation often due to a dysbiosis associated with antibiotics. Mucosal vaccination targeting colonization factors aims to confer a long lasting protection against early step of *C. difficile* pathogenesis. Several colonization factors have been identified to play a key role in host-pathogen interactions such as SlpA and FliC. Flagellin immunogenicity has been reported and thanks to its close interaction with the immune system through the innate and adaptive immunity, flagellin can be tested as a vaccine candidate or as an adjuvant.

**Aim of this study** : Here we first assessed the interest of flagellin (FliC) of *C. difficile* as a gut mucosal adjuvant compared to the flagellin of *Salmonella Typhimurium* (FLA-ST) and cholera toxin (CT) with ovalbumin (OVA) as antigen. Then FliC as an adjuvant was associated with SlpA with a view to design mucosal vaccine against colonization factors of *C. difficile*.

## Mucosal adjuvanticity of FliC

Groups	Antigen	Adjuvant	Immunization route
PBS control	OVA 20 µg	-	Intra-rectal (IR)
CT	OVA 20 µg	CT 7µg	Intra-rectal (IR)
FLA-ST	OVA 20 µg	FLA-ST 7µg	Intra-rectal (IR)
FliC	OVA 20 µg	FliC 7µg	Intra-rectal (IR)
FliC	OVA 20 µg	FliC 7µg	Intra-peritoneal (IP)



\* p-value < 0.05

➤ FliC as an adjuvant is susceptible to stimulate a mucosal and a systemic antigen-specific antibody response.

➤ FliC induces a stronger response via the intra-peritoneal route than the intra-rectal-route.

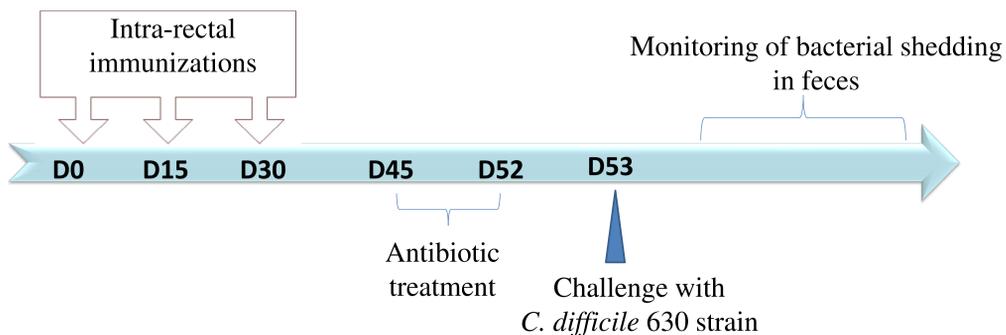
➤ FliC and CT don't induce the same response via the IR-route:

- CT → systemic IgG
- FliC → systemic IgG and local IgA

## Mucosal vaccination with FliC as an adjuvant and SlpA as antigen

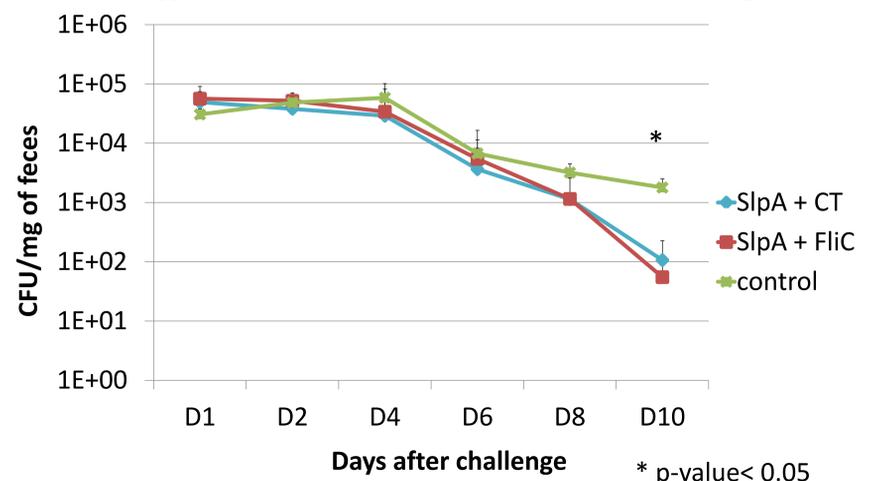
• 3 groups of 6 C57BL/6 mice intra-rectally immunized with S-layer protein A of *C. difficile* (SlpA) as antigen:

- SlpA (50 µg) + cholera toxin (CT) (7 µg)
- SlpA (50 µg) + *C. difficile* recombinant FliC (7 µg)
- PBS only



➤ On day 10: Significant decrease of *C. difficile* intestinal colonization for mice immunized with SlpA and FliC as adjuvant compared to control

## *C. difficile* intestinal colonization after challenge



## Conclusion

Intra-rectal immunizations of mice with flagellin FLA-ST and FLIC as an adjuvant induce a systemic IgG response but in a lower level than CT. Whereas flagellin-adjuvanted immunizations induce a stronger local IgA response than CT and with a significantly difference with FliC as an adjuvant. Intra-peritoneal immunization with FliC as an adjuvant induce a systemic and a mucosal IgG and IgA response.

In a mucosal vaccination assay targeting *C. difficile* colonization, we previously showed that SlpA represent a promising antigen. When SlpA is adjuvanted with FliC, here we have observed a promising decrease of *C. difficile* intestinal colonization. Therefore our results showed that FliC could be used as an adjuvant for further investigation in mucosal vaccination strategy against *C. difficile* infections.

J-F. Bruxelles<sup>1</sup>, S.L. Michell<sup>2</sup>, A. Kovacs-Simon<sup>2</sup>, S. Hoys<sup>1</sup>, C. Janoir<sup>1</sup>, S. Péchiné<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 4043 "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup>Bioscience, College of Life and Environmental Sciences, University of Exeter, UK.

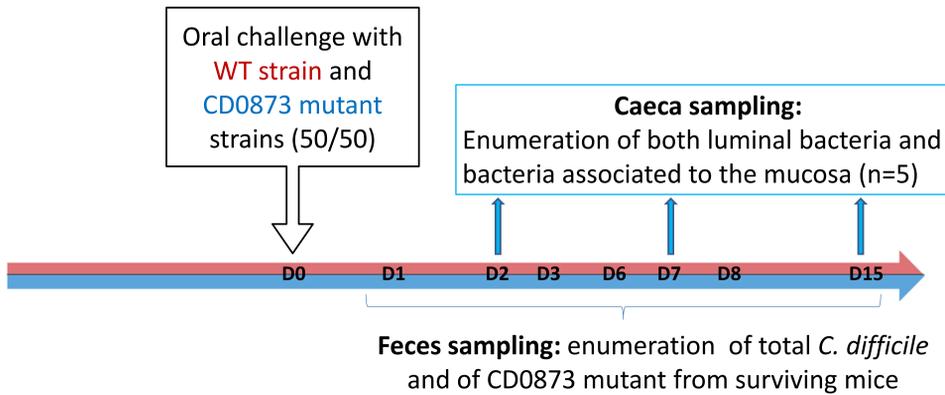
## Introduction

*Clostridium difficile* is responsible for various intestinal symptoms from mild diarrhea to severe pseudomembranous colitis and is the first cause of antibiotic-associated diarrhea in adult. *C. difficile* gut colonization is a critical step and enables the bacteria to persist in the intestine in spore state and then disseminate in the environment. Several surface proteins playing a role in the establishment of *C. difficile* have already been described. The lipoprotein CD0873 was previously identified *in vitro* as an adhesin through association to Caco-2 cells (A. Kovacs-Simon et al. JID, 2014).

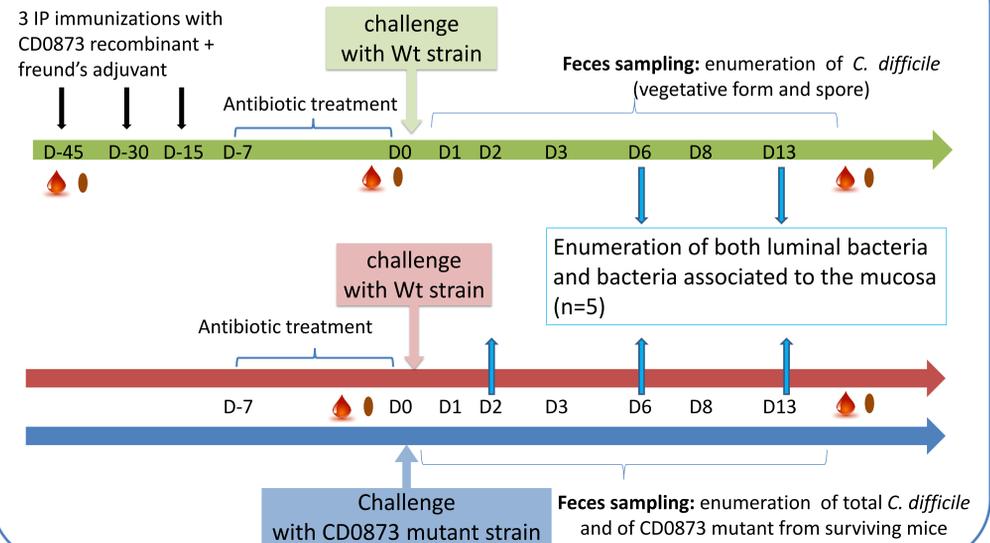
**Aim of the study:** we tested the role of CD0873 *in vivo* in colonization process. First in a dioxenic mice model of *C. difficile* competition, we compared the fitness of the CD0873 mutant and Wild type strain. Then in conventional mice model of *C. difficile* colonization, we compared the intestinal colonization of the CD0873 mutant to the WT strain. Finally we assessed the protection against *C. difficile* colonization after intra-peritoneal (IP) immunizations with recombinant CD0873.

## Materials & Methods

### Dioxenic mouse model of competition:

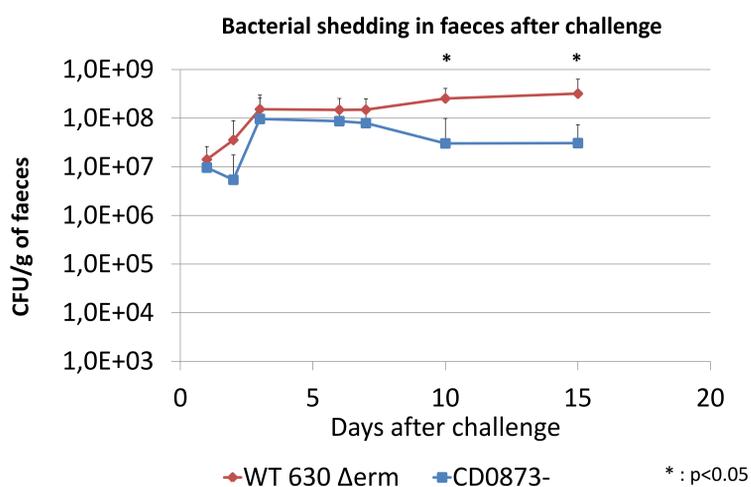


### Colonization assays in conventional mice:

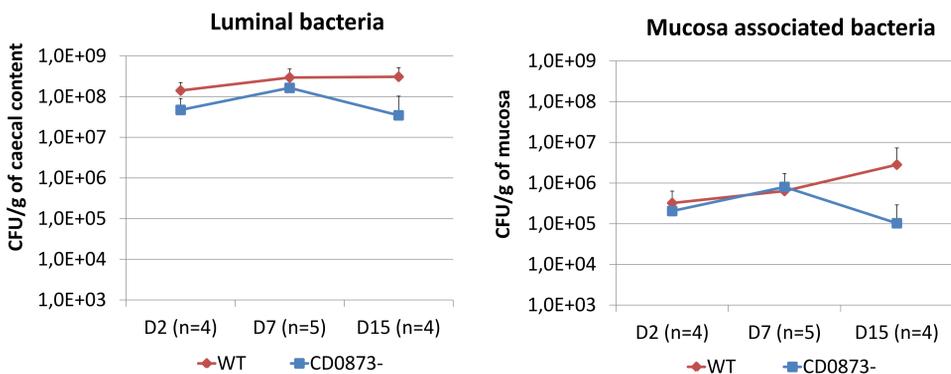


## Results

### Dioxenic mouse model of competition:

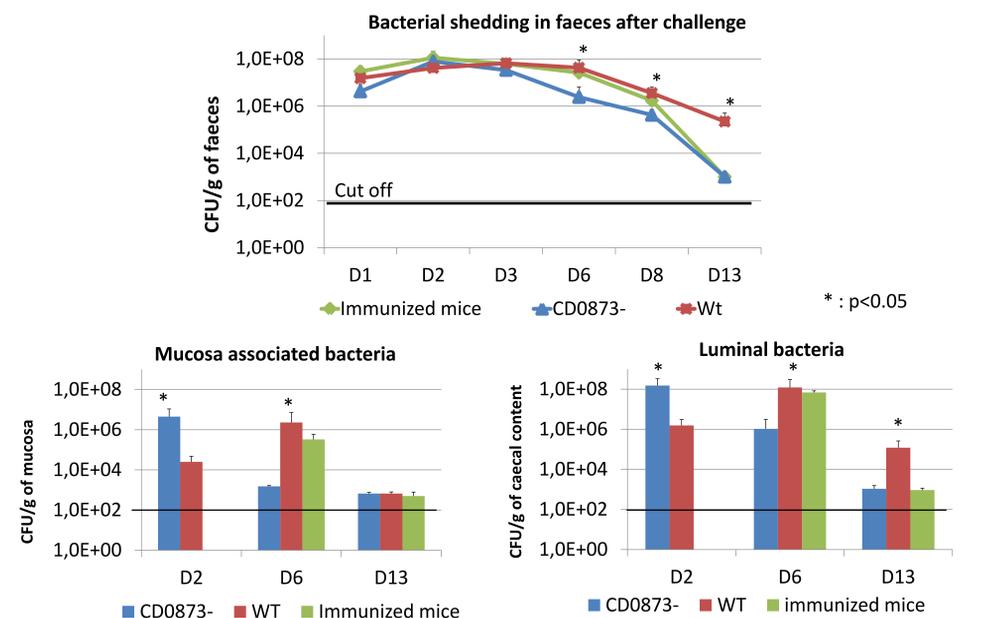


➤ During the late colonization time (D10-15) in dioxenic mice model: the **CD0873 mutant fitness is outcompeted by the WT strain**

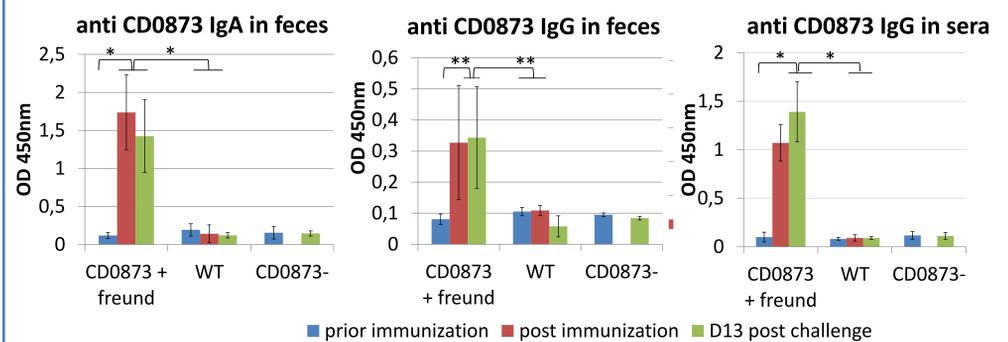


➤ After D7, decrease of luminal and mucosa associated CD0873 mutant compared to the WT strain

### Colonization assays in conventional mice:



➤ Since D6: significant **decrease of intestinal colonization by the CD0873 mutant** compared to WT  
 ➤ At D13: significant **decrease of intestinal colonization by the WT** after immunization with CD0873



➤ Significant mucosal **IgA and IgG** and **systemic IgG** response anti-CD0873 after parenteral immunization with CD0873 and Freund's adjuvant

## Conclusion

These results attest that the lipoprotein **CD0873** represents a factor involved in the long term intestinal colonization of *C. difficile*:

- After co-infection of axenic mice with the CD0873 mutant strain and the wild-type strain, the intestinal colonization level was always lower for the CD0873 mutant, the difference was significant since day 10 after challenge.
- We **confirmed the loss of colonization fitness of the CD0873 mutant** in a conventional mouse model of *C. difficile* infection. We observed a significant decrease in the colonization rate in the group infected with the mutant, from the day 6 to the end of the experiment.
- Third, **intra-peritoneal immunizations of conventional mice with CD0873** was able to reduce *C. difficile* intestinal colonization and in a significant way at day 13 after challenge, this partial protection was **correlated with a mucosal IgA and IgG and a systemic IgG response anti-CD0873**.

**Titre :** Développement d'une stratégie vaccinale par voie muqueuse ciblant les protéines de surface de *Clostridium difficile*

**Mots clés :** *Clostridium difficile*, vaccin, facteurs de colonisation, antigènes de surface, adjuvants

**Résumé :** *Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie stricte responsable de diarrhées consécutives à une antibiothérapie et de colites pseudomembraneuses. La destruction du microbiote intestinal de barrière favorise l'implantation de *C. difficile*, qui se multiplie, adhère aux cellules épithéliales et produit les toxines TcdA et TcdB. Les infections à *C. difficile* sont devenues un problème majeur de santé publique. En particulier les nombreuses rechutes posent un véritable problème thérapeutique. L'immunisation active est une des approches permettant de prévenir les rechutes et de réduire l'incidence des infections. *C. difficile* étant un entéropathogène non invasif, l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse au plus près du site de l'infection au niveau du colon devrait permettre une protection efficace contre les infections à *C. difficile*. Notre objectif a été de développer une stratégie vaccinale par voie muqueuse pour lutter contre la colonisation intestinale.

Des protéines de surface de *C. difficile* ainsi que la toxine TcdB ayant un rôle dans la pathogénicité ont été sélectionnées et utilisées comme cibles vaccinales. Certains candidats vaccinaux ont été encapsulés afin de pouvoir délivrer les antigènes au niveau de la muqueuse intestinale par voie orale. De plus, pour induire une réponse immunitaire localisée au niveau de la muqueuse intestinale, différents adjuvants ont été testés. Lors des essais de vaccination nous avons analysé la réponse immunitaire induite au niveau local et systémique. Pour identifier de nouveaux candidats vaccins, le rôle de différentes protéines de surface dans la colonisation intestinale par *C. difficile* a été caractérisé. Les essais in vivo ont été menés dans deux modèles animaux de référence pour les infections à *C. difficile* : la souris et le hamster, pour suivre respectivement la colonisation intestinale par *C. difficile* et le taux de survie après infection.

**Title :** Development of a mucosal vaccine strategy targeting surface proteins of *Clostridium difficile*

**Keywords :** *Clostridium difficile*, vaccine, colonization factors, surface antigens, adjuvants

*Clostridium difficile* is an anaerobic bacterium that is responsible for post-antibiotic diarrhea and pseudomembranous colitis. The disruption of the intestinal microbiota barrier effect promotes the establishment of *C. difficile*, which multiplies, adheres to epithelial cells, and produces the toxins TcdA and TcdB. *C. difficile* infections are considered as a major public threat. In particular, the multiple recurrences are difficult to treat. Active immunization is one of the new approaches to reduce recurrences and the incidence of these infections. *C. difficile* is an enteropathogenic noninvasive bacterium, the induction of a mucosal immune response in the colon could allow an effective protection against *C. difficile* infections. Our objective was to develop a mucosal vaccine strategy to combat intestinal colonization.

Surface proteins of *C. difficile* and TcdB involved in the pathogenic process were selected and used as vaccine targets. These antigens were produced and encapsulated to deliver them to the intestinal mucosa. Furthermore, to induce a gut mucosal immunity, different adjuvants were tested. After vaccination, we analyzed the local and systemic immune response by immunoassays. Finally, in order to characterize new vaccine candidates, the role of different surface proteins in *C. difficile* colonization was evaluated. These vaccine trials were conducted in two animal models of reference for *C. difficile* infections: the mouse and the hamster models, which permit to follow respectively the colonization and the survival rate after infection.

