



Caractéristiques toxiques et diversité génétique des souches de *Clostridium perfringens* impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives en Ile-de-France

Abakabir Mahamat Abdelrahim

► To cite this version:

Abakabir Mahamat Abdelrahim. Caractéristiques toxiques et diversité génétique des souches de *Clostridium perfringens* impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives en Ile-de-France. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2019. Français. NNT : 2019PESC2086 . tel-03384481

HAL Id: tel-03384481

<https://theses.hal.science/tel-03384481>

Submitted on 19 Oct 2021

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

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

THÈSE

N°/ / / / / / / / / / /

pour obtenir le grade de

Docteur

de

L'Université Paris Est

et

L'Ecole Doctorale ABIES

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement par

Abakabir Mahamat ABDELRAHIM

Le 6 mars 2019

***Caractéristiques toxiques et diversité génétique des souches de
Clostridium perfringens impliquées dans des TIAC en Ile-de-France***

Directeur de thèse : **Dr Michel-Yves MISTOU**

Encadrant : **Dr Olivier FIRMESSE**

Co-encadrant : **Dr Jacques-Antoine HENNEKINNE**

Jury :

Mme Claire Janoir, Professeur, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France

Présidente

M. Frédéric Carlin, Directeur de Recherche, INRA, Avignon, France

Rapporteur

Mme Anne-Marie Pourcher, Directeur de Recherche, IRSTEA, Rennes, France

Rapporteur

M. Stéphane Chaillou, Directeur de Recherche, INRA, Jouy-en-Josas, France

Examineur

M. Michel-Yves Mistou, Directeur de Recherche, Anses, Maisons-Alfort, France

Directeur de thèse

M. Olivier Firmesse, Ingénieur d'Etude, Anses, Maisons-Alfort, France

Encadrant

RÉSUMÉ

Clostridium perfringens représente le quatrième agent pathogène responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France et en Europe. La bactérie est classée en sept toxinotypes (de A à G), en fonction de la production de six toxines majeures (CPA, CPB, ETX, ITX, CPE et NetB). Le rôle de l'entérotoxine CPE, codée par le gène *cpe* dans les intoxications alimentaires, est bien établi. Cependant, 22 facteurs de virulence, comprenant des toxines et des enzymes hydrolytiques, ont été décrits dans la littérature. Leur impact sur l'étiologie des TIAC reste inconnu, d'autant plus que la méthode de référence utilisée afin de certifier la présence de *C. perfringens* dans les aliments impliqués dans des épisodes toxiques – à savoir la norme EN NF ISO 7937 – n'augure pas de leur pathogénicité. En outre, il n'existe pas de méthode de typage permettant de relier les souches de *C. perfringens* à des réservoirs particuliers ou encore à leur prévalence dans les TIAC.

Cette thèse avait comme premier objectif la caractérisation toxinique d'une collection de 146 souches de *C. perfringens* impliquées dans des TIAC en région parisienne entre 2013 et 2018. Cette collection de souches est la plus vaste décrite pour les toxi-infections alimentaires. Pour cela, une étude des profils des gènes de virulence a été réalisée. Les résultats de la caractérisation toxinique ont révélé une grande diversité génétique, puisque 15 profils différents ont été obtenus pour les 44 TIAC étudiées. Des profils hétérogènes ont été mis en évidence au cours d'une même TIAC, en particulier pour les souches possédant le gène *cpe*. De plus, des TIAC où uniquement des souches de *C. perfringens* *cpe*-négatif (*cpe*-) ont été identifiées, nous amènent à nous interroger sur l'implication exclusive de la CPE dans la survenue d'un épisode toxique.

Le deuxième objectif de mon travail était la réalisation d'une analyse génomique détaillée, afin d'identifier des marqueurs génétiques permettant de caractériser les souches de *C. perfringens* impliquées dans des TIAC.

Une reconstruction phylogénomique basée sur le polymorphisme nucléotidique (SNP) du core-génome a donné lieu à une séparation en deux clades, conduisant à distinguer, d'une part, des souches *cpe*-positif (*cpe*+) chromosomique et, d'autre part, des souches (*cpe*+) plasmidique et *cpe*-négatif (*cpe*-). L'analyse du pan-génome a révélé que *C. perfringens* est le pathogène le plus diversifié actuellement décrit avec un génome conservé ne représentant que 6% (core-génome) de la taille du génome. Cette caractéristique pangénomique lui permet une adaptation à diverses niches environnementales.

Une analyse comparative des gènes du core-génome des populations *cpe*+ et *cpe*- a abouti à l'identification de 85 gènes spécifiques aux souches *cpe*+ et de 132 gènes spécifiques aux souches *cpe*-.

Une caractérisation du mobilome a permis d'identifier 5 types de plasmides différents, décrits comme porteurs de gènes de toxines et de résistance aux antibiotiques. L'analyse du résistome indique la présence du gène *mprF* dans toutes les 146 souches de la collection. Une résistance potentielle à la tétracycline (*tet(A)P* et *tet(B)P*) et à la bacitracine (*bcr*) ont été mises en évidence indiquant un risque potentiel de résistance des souches impliquées dans les TIAC aux antimicrobiens. Notre analyse du mobilome a permis d'identifier des événements de transferts horizontaux par la présence de phages et du système CRISPR dans respectivement 73% et 63% des souches étudiées. Ce fort taux de phages résulte de la diversification de l'hôte et de l'adaptation du *C. perfringens* à différentes niches écologiques.

Enfin, cette thèse avait pour troisième objectif de caractériser les souches de *C. perfringens* en fonction de leur cytotoxicité dans un modèle *in vitro* afin de déterminer leur pouvoir pathogènes. A l'exception de six souches, l'étude de toxicité *in vitro* réalisée à partir des surnageants de formes végétatives sur des cellules Caco-2 a révélé très peu de cytotoxicité. Ces résultats pourraient être dus aux limites du modèle cellulaire Caco-2 qui ne reflète pas la complexité de l'intestin ou à la faible production des toxines dans les conditions de culture utilisées.

Ainsi, ces travaux ont permis de contribuer à améliorer la caractérisation toxinique de *C. perfringens* en déterminant les profils de gènes de virulence, au niveau génomique par l'identification des éléments génétiques mobiles et en explorant le potentiel cytotoxique des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC.

Mots-clés : TIAC, *Clostridium perfringens*, entérotoxine, profils de gènes de virulence, facteurs de virulence, séquençage de génome complet, cytotoxicité

ABSTRACT

Clostridium perfringens represents the fourth agent responsible for foodborne outbreaks (FBO) in France and the rest of Europe. The bacterium is classified into seven toxinotypes (A-G) based upon the production of six major toxins, namely CPA, CPB, ETX, ITX, CPE and NetB. It has been demonstrated that the enterotoxin CPE, encoded by the *cpe* gene, is essential to the development of gastroenteritis. However, 22 virulence factors comprising toxins and hydrolytic enzymes produced by *C. perfringens* strains are currently established in the literature for which no functional data are available, and their role in FBO remains unknown since the reference method namely -EN NF ISO 7937- used to certify the presence of *C. perfringens* involved in FBO is not able to provide any phenotypic information with regard to their virulence. In addition, no genotypic characterization is currently available to link *C. perfringens* strains to a particular reservoir or their prevalence in FBO.

The first objective of this PhD thesis was to characterize virulence gene profiles of *C. perfringens* strains considering all *C. perfringens* virulence factors identified to date. The result revealed a considerable diversity, since 15 different virulence gene profiles were obtained from a collection of 146 strains implicated in 44 FBOs in the Paris region between 2013 and 2018. Heterogeneous virulence gene profiles from multiple strains isolated during the same FBO have been demonstrated in particular for the presence of the *cpe* gene. The results of virulence gene profiling also revealed cases in which *C. perfringens* was the only pathogen identified in the incriminated food, but none of the recovered strains was positive for the *cpe* gene, which brings into hypothesis that *cpe*- strains may be associated with FBO.

The second research objective was to perform a more detailed genomic analysis in order to identify genetic markers that characterize *C. perfringens* strains involved in FBOs. Phylogenomic reconstruction using core genome SNPs identified two distinct clades, with chromosomal *cpe*⁺ strains in one clade and plasmid *cpe*⁺ and *cpe*⁻ in the other clade.

Comparative genomic analysis carried out on core genes identified 85 genes specific to *cpe*⁺ strains and 132 genes specific to *cpe*⁻ strains. Pan- and core-genome analyses revealed the conservation of 6 % of the genome (core-genome) throughout the 146 strains, with a large and open pan-genome. This pan-genomic feature enables different strains to survive in diverse environmental niches.

Genome scanning for mobilome identified 5 different types of plasmids described as carrying toxins and antibiotic resistance genes. In relation to antibiotic resistance genes. Analysis of the resistome indicate the presence of *mprF* gene in 146 strains of the collection. Potential resistance to tetracycline (*tet(A)P* and *tet(B)P*) and to bacitracin (*bcr*) was identified indicating a risk of resistance among *C. perfringens* strains involved in FBOs.

Analysis of the mobilome identified the presence of phages in 73 % and CRISPR-Cas systems in 64 % of isolates studied. This high presence of phages results from the diversification of the host and the adaptation of *C. perfringens* to different ecological niches.

Finally, the third research objective was to characterize the cytotoxicity of *C. perfringens* strains *in vitro* in order to differentiate pathogenic from non-pathogenic strains. Cytotoxicity of strains was characterized in a relevant *in vitro* model after exposure of Caco-2 cells to vegetative *C. perfringens* supernatant. With the exception of six strains, very little cytotoxicity was observed in Caco-2 cells with vegetative *Clostridium perfringens* supernatants. This difference between the expected results and those obtained could be due to the inadaptability of the Caco-2 cell model which does not reflect the complexity of the intestine or due to the low production of toxins in bacteriological culture medium.

This work led to a better toxic characterization of *C. perfringens* by determining virulence gene profiles at the genomic level by identifying mobile genetic elements and exploiting the cytotoxic potential of *C. perfringens* strains involved in FBO.

Keywords: Foodborne outbreak, *Clostridium perfringens* enterotoxin, virulence gene profiles, virulence factors, whole genome sequencing, cytotoxicity

REMERCIEMENT

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Sécurité des Aliments à l'Anses de Maisons-Alfort au sein de l'unité *Staphylococcus Bacilus* et *Clostridies* (SBCL). Elle est le fruit des conseils et aides de plusieurs personnes. Je tiens tout d'abord à remercier l'Anses pour l'accueil et le financement du projet et la Banque Islamique de Développement pour le financement.

Je tiens à remercier Frédéric CARLIN et Anne-Marie POURCHER du temps consacré pour évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie Stéphane CHAILLOU et Claire JANOIR pour leur participation au jury en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier Laurent LALOUX pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Sécurité des Aliments.

Je remercie Colin TINSLEY, Anne COLLIGNON et Shaynoor DRAMSI, membres du comité de pilotage pour le suivi des travaux et pour leurs conseils.

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Michel-Yves MISTOU pour avoir accepté de diriger ma thèse. Je le remercie pour ses conseils et ses orientations qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide, les conseils les encouragements et l'implication personnelle de mon encadrant Olivier FIRMESSE. Je tiens à le remercier pour son encadrement tout au long de cette thèse et pour sa brillante expérience qu'il m'a fait partagée. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et la confiance placée en moi pour continuer à travailler ensemble.

Je remercie Jacques-Antoine HENNEKINNE de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de l'unité SBCL, pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils et son soutien moral durant ces trois années et pour la confiance placée en moi.

Je remercie sincèrement Marylène Le NEGRATE pour m'avoir partagée son immense expérience en microbiologie conventionnelle, ses conseils dans la démarche qualité et l'organisation du travail et pour les sages conseils qu'elle m'a prodigués dans le cadre du travail et en dehors du cadre de travail.

Je remercie Nicolas RADOMSKI, Laurent GUILLER et Déborah MERDAH pour l'aide et les conseils qu'ils m'ont apportés en génomique et en biostatistique. Qu'ils soient aussi remerciés pour leur disponibilité et leur gentillesse. Merci Déborah pour la relecture du manuscrit.

Je tiens à remercier Patrick FACH pour avoir accepté que je puisse réaliser les analyses PCR au sein de l'unité IdentityPath et Sabine DELANNOY pour son aide dans la réalisation des analyses PCR haut débit.

Je remercie Sofia DJELLAL et Katia HADJAB pour leur apport considérable dans la réalisation de mes travaux et Muriel MARAULT pour son aide et son implication.

Je remercie tous mes collègues de l'unité SBCL, mes camarades de l'Open space pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie mes parents pour leur éducation et les sacrifices qu'ils ont consentis pour que je puisse arriver à ce niveau, sans oublier mes frères et sœurs.

Je remercie mon ami ABDEL-AZIZ Arada Izzédine pour ses encouragements, son aide et sa compagnie tout le long de la 2^e année.

Pour finir, un grand merci à mon épouse ABDELRAHIM Khadidja Ahmat pour son soutien et son encouragement tout au long de cette thèse et pendant les moments difficiles. Un grand merci à mes enfants pour leur sagesse dont ils ont fait preuves durant ces trois années.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ANNEXES	13
LISTE DES ABREVIATIONS	14
PRÉAMBULE	16
I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	21
CHAPITRE 1. TAXONOMIE ET CARACTÉRISTIQUES DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	23
1.1 Taxonomie	23
1.2 Caractéristiques de l'espèce <i>C. perfringens</i>	24
1.3 Classification de <i>C. perfringens</i> en fonction du toxinotype	26
1.4 Les facteurs de virulence de <i>C. perfringens</i>	28
1.4.1 Toxines formant un pore	30
1.4.2 Les toxines de <i>C. perfringens</i> à activités hydrolytiques – Hydrolases.....	36
1.4.3 Toxines à activités ADP ribosyl-transférases.....	41
CHAPITRE 2. SPORULATION ET INFECTIONS CHEZ <i>C. PERFRINGENS</i>	43
2.1. Spores	43
2.1.1. Induction de la sporulation	44
2.1.2. Processus de sporulation	44
2.1.3. Régulation de la production de facteurs virulence	46
2.2. Physiopathologie de <i>C. perfringens</i>	48
2.3. Épidémiologie des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à <i>C. perfringens</i>	52
2.3.1. Déclaration des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)	52
2.3.2. Surveillance et incidence de TIAC en France	53
2.3.3. Incidence de TIAC à <i>C. perfringens</i>	54
2.3.4. Sources de contamination	55
2.3.5. Lieux de survenue de TIAC à <i>C. perfringens</i>	56
2.3.6. Mode de contamination des aliments	56
CHAPITRE 3. MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DE <i>C. PERFRINGENS</i>	57
3.1. Test de neutralisation sur souris.....	57
3.2. Méthode normalisée de détection de <i>C. perfringens</i>	57
3.3. Méthodes moléculaires	58
3.3.1. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	58
3.3.2. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)	58
3.3.3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	58
3.3.4. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	59
3.3.5. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR).....	59
3.3.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)	59
3.4. Apport de la génomique à la caractérisation de <i>C. perfringens</i>	60
3.4.1. Séquençage de génomes	60
3.4.2. Caractéristiques générales du génome de <i>C. perfringens</i>	61
3.4.3. Génomique comparative de <i>C. perfringens</i>	62
3.5. Éléments génétiques mobiles (EGM)	63
3.5.1. Définition et terminologie.....	63
3.5.2. Les séquences d'insertion	64
3.5.3. Les plasmides	64

3.5.4.	Les phages	65
3.5.5.	Le système CRISPR-Cas	66
3.5.6.	Fonctionnement du système CRISPR-Cas	67
3.5.7.	Le système CRISPR-Cas chez <i>C. perfringens</i>	68
3.6.	Résistance aux antibiotiques	69
3.6.1.	Résistances naturelles.....	69
3.6.2.	Résistances acquises.....	69
II – RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX		71
CHAPITRE 1. CARACTERISATION TOXINIQUE ET GENOMIQUE DES SOUCHES DE <i>C. PERFRINGENS</i> IMPLIQUÉES DANS LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES		73
1.1.	Contexte et objectif	73
1.2.	Résumé de l'article	75
1.3.	Article	77
1.4.	Conclusion et perspectives.....	93
CHAPITRE 2. EXTENSION DE LA COLLECTION ET CARACTERISATION GENOMIQUE DES ELEMENTS GENETIQUE MOBILES		95
2.1.	Contexte et objectifs.....	95
2.2.	Matériels et méthodes.....	98
2.2.1.	Souches bactériennes et conditions de culture	98
2.2.2.	Extraction d'ADN pour le séquençage du génome complet	99
2.2.3.	Séquençage, assemblage et annotation	99
2.2.4.	Recherche de variants « Variant calling »	101
2.2.5.	Inférence phylogénomique core-génome	102
2.2.6.	Construction du pan-génome	102
2.2.7.	Annotation fonctionnelle.....	102
2.2.8.	Détection <i>in silico</i> des éléments génétiques mobiles	103
2.2.8.1.	Détection des phages	103
2.2.8.2.	Détection des plasmides	104
2.2.8.3.	Identification des systèmes CRISPR-Cas	105
2.2.8.4.	Identification des gènes de résistance aux antimicrobiens.....	105
2.3	Résultats	107
2.2.9.	Statistiques sur l'évaluation de la qualité de l'assemblage	107
2.2.10.	Inférence phylogénomique core-génome de la collection	107
2.2.11.	Distribution des souches de <i>C. perfringens</i> en fonction de leurs origines alimentaires	109
2.2.12.	Étude comparative du core-génome et pan-génome.....	111
2.2.13.	Identification des marqueurs spécifiques.....	114
2.2.14.	Caractérisation des souches en fonction des éléments génétiques mobiles.....	116
2.2.14.1.	Identification des plasmides.....	116
2.2.14.2.	Profils de résistance aux antimicrobiens (détection <i>in silico</i>).....	117
2.2.14.3.	Présence de phages.....	119
2.2.14.4.	Détection et analyse comparative de systèmes CRISPR-Cas	121
2.3.	Discussion	124
2.3.1.	Analyse phylogénomique de la collection	124
2.3.2.	Description fonctionnelle du pan-génome	125
2.3.3.	Profils plasmidiques	126
2.3.4.	Détection des gènes de résistance aux antimicrobiens	128
2.3.5.	Profils phagiques.....	129
2.3.6.	Identification des Loci- CRISPR-Cas	129
2.4.	Conclusion et perspectives	131

CHAPITRE 3. EFFET CYTOTOXIQUE DES SOUCHES DE *C. PERFRINGENS* ISOLEES À PARTIR DE TIAC 133

3.1.	Contexte et objectifs.....	133
3.2	Matériels et méthodes	135
3.2.1	Sélection des souches et préparation des surnageants de cultures bactériennes.....	135
3.2.1.	Culture cellulaire	135
3.2.2.	Entretien des cellules Caco-2	135
3.2.3.	Le test au MTT	136
3.2.4.	Le test ELISA de dosage des cytokines inflammatoires.....	137
3.2.5.	Analyse du contenu cellulaire	138
3.2.6.	Analyses des cellules vivantes.....	139
3.2.7.	Analyses des cellules fixées.....	140
3.2.8.	Traitement des données	141
3.3.	Résultats	143
3.3.1.	Tests de cytotoxicité	143
3.3.2.	Évaluation des effets inflammatoires induits par les souches de <i>C. perfringens</i> et production d'interleukine (IL-8)	145
3.4.	Discussion	147
3.5.	Conclusion et perspectives	149

III – CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES..... 151

IV – VALORISATION 157

V – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES161

VI– ANNEXES185

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Relation phylogénétique entre les espèces de <i>Clostridium</i> pathogène sur la base de l'ARNr 16S d'après (Collins et al., 1994). La phylogénie a été construite en utilisant la méthode de Neighbor-joining à partir de 1000 réplicats	24
Figure 2. Colonies de <i>C. perfringens</i> sur gélose au sang (A) : colonies circulaires une double hémolyse α et β , sur gélose TSC (B) : colonies noires dues à la production de H ₂ S.	25
Figure 3. Model général du mécanisme d'action des β -PFTs (Popoff, 2014).	30
Figure 4. Organisation génétique du locus <i>cpe</i> chromosomique chez les souches de <i>C. perfringens</i> de type A (d'après Miyamoto et al. (2002).	33
Figure 5. Mécanisme d'action de la CPE.	34
Figure 6. Schéma général de la structure de la spore bactérienne.....	43
Figure 7. Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation de <i>C. perfringens</i> d'après (Al-Hinai et al., 2015).	45
Figure 8. Etapes menant à une intoxication alimentaire à <i>C. perfringens</i> , (Xiao et al., 2014)	49
Figure 9. Modes d'actions concertés de facteurs de virulence de <i>C. perfringens</i> sur l'épithélium intestinale d'après (Goossens et al., 2017).	51
Figure 10. Evolution du nombre de foyers de TIAC suspectées par agent pathogène entre 2007 et 2016.	54
Figure 11. Evolution du nombre de foyers de TIAC suspectées par agent pathogène entre 2007 et 2016.	55
Figure 12. Organisation des loci du système CRISPR-cas de type II.	67
Figure 13. Fonctionnement du système CRISPR-Cas chez la bactérie.....	68
Figure 14. Histogramme montrant le nombre de souches par origine alimentaire.....	98
Figure 15. Vue simplifiée des étapes de traitement implémentées dans le pipeline ARTWork.....	101
Figure 16. Évaluation des paramètres de l'assemblage montrant la moyenne du nombre de petits contigs (A) et la taille de grands contigs (B).....	107
Figure 17. Phylogénie basée sur la variation de polymorphismes nucléotidiques (SNP) du core-génome de 146 souches de <i>C. perfringens</i>	110
Figure 18. Pan-génome des 146 souches de <i>C. perfringens</i> montrant les proportions des gènes core, présents dans au moins 99 % des souches, des gènes accessoires présents dans 2	

souches ou plus, mais moins de 99 % des souches et des gènes uniques présents dans une seule souche.....	111
Figure 19. Nombre de gènes totaux et conservés dans le pan-génome de la collection.....	112
Figure 20. Répartition fonctionnelle des protéines COG prédites par les gènes core (histogrammes bleues) et les gènes accessoires (histogrammes rouges)	113
Figure 21. Répartition fonctionnelle des protéines COG prédites par les gènes uniques. Les couleurs représentent les grandes fonctions métaboliques.....	114
Figure 22. Diagramme de comparaison des gènes communs et spécifiques aux souches de <i>C. perfringens</i> possédant le gène <i>cpe</i> (<i>cpe+</i>) et dépourvues du gène <i>cpe-</i>	115
Figure 23. Distribution fonctionnelle des COG prédites par les gènes spécifiques aux souches de <i>C. perfringens</i> <i>cpe+</i> et <i>cpe-</i>	116
Figure 24. Types de plasmides et le nombre des souches détectées dans notre collection de <i>C. perfringens</i>	117
Figure 25. Distribution des gènes codants la résistance au antimicrobiens.....	119
Figure 26. Répartition des phages détectés dans la collection de <i>C. perfringens</i>	120
Figure 27. Phylogénie core-génome associée à la distribution des phages dans les génomes de <i>C. perfringens</i>	121
Figure 28. Nombre de locus CRISPR détectés dans les génomes de <i>C. perfringens</i>	123
Figure 29. Principe du test MTT.....	136
Figure 30. Principe du test ELISA (A) et du test ELISA sandwich (B).....	137
Figure 31. Schéma de différentes étapes du protocole de traitement et de l'analyse ELISA...	138
Figure 32. Procédure d'analyse sur le VTi array scan.....	139
Figure 33. Cytotoxicité des souches 16SBCL110 et 16SBCL 624 après 24 heures de traitement.....	143
Figure 34. Cytotoxicité des souches induisant une faible cytotoxicité après 24 heures de traitement.....	144
Figure 35. Nombre et concentrations induisant la production de l'IL-8.....	145
Figure 36. Souches induisant une forte production d'IL8 à partir de 3,12 %. (A) pour la souche 17SBCL85 et (B) pour la souche 16SBCL624.....	146

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification phénotypique de <i>C. perfringens</i>	26
Tableau 2. Principales maladies associées aux toxinotypes de <i>C. perfringens</i>	27
Tableau 3. Nouvelle classification de <i>C. perfringens</i> selon (Rood et al., 2018)	28
Tableau 4. Propriétés des facteurs de virulence de <i>C. perfringens</i>	29
Tableau 5. TIAC déclarées aux ARS et ou aux DDPP- France, 2016.....	53
Tableau 6. catégorie fonctionnelle des COG (Tatusov et al., 2003).....	103
Tableau 7. Comparaison des souches sur la base de leurs profils de gènes de virulence (GV) et leur variation génomique.....	109

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Description des souches de <i>C. perfringens</i> impliquées dans les TIAC.....	195
Annexe 2. Principe de l'extraction de l'ADN avec le kit WIZARD Genomic DNA Purification de PROMEGA (réf : A1120).....	197
Annexe 3. Description des génomes de 146 souches de <i>C. perfringens</i>	198
Annexe 4. Protocole de préparation des surnageants bactériens.....	202
Annexe 5. Protocole de réalisation des tests ELISA.....	203
Annexe 6. Description des souches analysées en cytotoxicité.....	204

LISTE DES ABREVIATIONS

AFLP	Amplified Fragment Length Ploymorphism
ANSM	Agence Nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
ARS	Agence Régionale de Santé
ATCC	American Type Culture Collection
BEC	Binary Enterotoxin for <i>Clostridium perfringens</i>
BLAST	Basic Local Alignment Sequence Tool
CDC	Center for Contrôle disease
CDS	Coding séquence
COS	Columbia au sang de mouton
CPA	<i>Clostridium perfringens</i> alpha toxin
CPB	<i>Clostridium perfringens</i> beta toxin
Cpd	<i>Clostridium perfringens</i> delta toxin
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
<i>C. perfringens cpe+</i>	<i>Clostridium perfringens</i> possédant le gène <i>cpe</i>
<i>C. perfringens cpe-</i>	<i>Clostridium perfringens</i> dépourvu du gène <i>cpe</i>
CRISPR	Clustered Regulary Interspaced Palandromic Repeat
DDPP	Direction Départementale de la Protéction des Poulations
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
DO	Déclaration Obligatoire
EFSA	European Food Safety Aurority
EGM	Elément Génétique Mobiles
EN	Norme Européenne
ETX	Epsilon toxin
FDA	Food and Drug Administration
IL-8	Interleukine 8

InVS	Institut National de Veil Sanitaire
IS	Insertion sequence
ISO	International Standardization Organization
ITX	Iota toxin
iVARCall2	Independent Variant Calling
kDa	Kilodalton
LCSV	Laboratoire Central des Services Vétérinaires
ML	Maximum Likelihood
MLEE	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis
MLST	Multi-Locus Sequence Type
mprF	Multi-resistance peptide factor
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NCTC	National Center for Type Collection
NetB	Necrotic Enteritis B like toxin
NF	Norme Française
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFOA	Perfringolysin O
PFT	Pore-forming toxin
PGFE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAxML	Randomized Axelerated Maximum Likelihood
SFP	Shahidi Ferguson perfringens
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SpF	Santé publique France
ST	Sequence Type
Tcp	Tansfer conjugaison plasmid
TIAC	Toxi-infection Alimentaire Collective
TpeL	Large Clostridial toxin
TSC	Tryptone Sulfite Cyclosérine
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
WDCM	World Data Center for Microorganisms
WGS	Whole Genome Sequencing

PRÉAMBULE

Les données épidémiologiques de dix dernières années sur les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France indiquent en moyenne que 1250 cas de TIAC sont déclarées chaque année touchant plus de 11500 personnes (InVS, 2007, 2008, 2012, 2013; Santé publique France, 2016). Les agents pathogènes les plus suspectés sont *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens* (InVS, 2008 ; Santé publique France, 2016). Le nombre des TIAC due à *C. perfringens* varie entre 30 et 150 par an affectant plus de 1500 personnes dont un décès en 2015 ce qui en fait la quatrième cause de TIAC en France après *Salmonella*, *S. aureus* et *B. cereus* (Santé publique France, 2016).

Sur la base de la production de six toxines majeures, CPA, CPB , ETX, ITX, CPE et NetB, *C. perfringens* est classé en sept toxinotype (A à G) (Rood et al., 2018). Le toxinotype F, producteur de l'entérotoxine CPE est actuellement considéré comme le plus impliqué dans les TIAC (Brynstad and Granum, 2002; Li et al., 2016; Scallan et al., 2011). Cependant, 22 facteurs de virulence sont actuellement décrits dans la littérature dont leur impact sur l'étiologie des TIAC reste inconnu (Kiu and Hall, 2018; Revitt-Mills et al., 2015). De plus, les investigations des TIAC causées par *C. perfringens* sont actuellement basées sur la norme EN NF ISO 7937. Cette méthode permet de mettre en évidence la présence de *C. perfringens* dans l'aliment contaminé mais ne donne aucune information sur la virulence des souches isolées. Dans ces conditions, le diagnostic d'une TIAC à *C. perfringens* se trouve confirmé lorsque des souches de *C. perfringens* productrices d'entérotoxine sont isolées à partir d'un aliment suspecté contaminé et dans les selles des malades. Un kit immuno-enzymatique existe et permet de mesurer de manière semi-quantitative la présence de la CPE dans les selles des patients et dans les surnageants de culture des souches de *C. perfringens*. De plus, la CPE est produite en phase de sporulation, ce qui nécessite au préalable la mise en sporulation des souches isolées de l'aliment suspecté avant de déterminer sa capacité à produire la CPE.

Pour surmonter ces difficultés, des méthodes PCR ont été développées pour détecter les gènes codant les facteurs de virulence y compris la CPE. Cependant, ces méthodes ne ciblent que les gènes codants les toxines majeures. De plus, aucune méthode génotypique ne permet d'identifier des marqueurs spécifiques aux souches impliquées dans les TIAC ou de les relier à une origine particulière.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse avec trois objectifs principaux, à savoir :

- I. Caractériser les souches de *C. perfringens* impliquées dans des TIAC en fonction de leur profil de gènes de virulence,
- II. Étudier la relation phylogénomique de ces souches afin d'identifier des marqueurs spécifiques permettant de distinguer les souches en fonction de leur virulence (souches *cpe*-positif (*cpe*+) et *cpe*-négatif (*cpe*-)) ou de leur matrice d'isolement (viandes, produits de la mer, végétaux ...),
- III. Caractériser ces souches en fonction de leurs effets cytotoxiques.

Après une synthèse bibliographique, les objectifs de ces travaux de thèse ont fait l'objet chacun d'un chapitre dans le présent manuscrit.

I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. TAXONOMIE ET CARACTÉRISTIQUES DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

1.1 Taxonomie

Le genre *Clostridium*, appartenant au phylum des Firmicutes, est composé de bacilles à Gram positif anaérobies stricts, aérotolérants et formant des endospores (Bennett et al., 2014). Le genre *Clostridium* comprend 110 espèces pathogènes et non pathogènes identifiées sur la base de caractères biochimiques et enzymatiques (Kalia et al., 2011; Prescott et al., 2016). Les espèces sont majoritairement mobiles grâce à des flagelles péritriches (Yutin et Galperin, 2013). Les espèces du genre *Clostridium* ont été classées phylogénétiquement en seize clusters en fonction de la similarité des gènes codants pour l'ARNr 16S (Prescott et al., 2016 ; Collins et al., 1994) (**Figure 1**). Les principales espèces pathogènes pour l'Homme (*Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, et *Clostridium perfringens*) à l'exception de *Clostridium difficile* et *Clostridium sordellii* partagent un ancêtre commun et appartiennent au cluster I défini par Collins et al. (1994) et Prescott et al. (2016). *C. perfringens* se distingue des autres clostridies par sa capacité à fermenter le glucose, le maltose, le lactose, et le saccharose, et à produire de la lécithinase et du sulfure d'hydrogène (SH₂). *C. perfringens* est capable de survivre à des conditions de stress induit par un potentiel redox élevé, allant de 250 mV à 350 mV, grâce aux complexes enzymatiques superoxyde dismutase et superoxyde réductase (Jean et al., 2004).

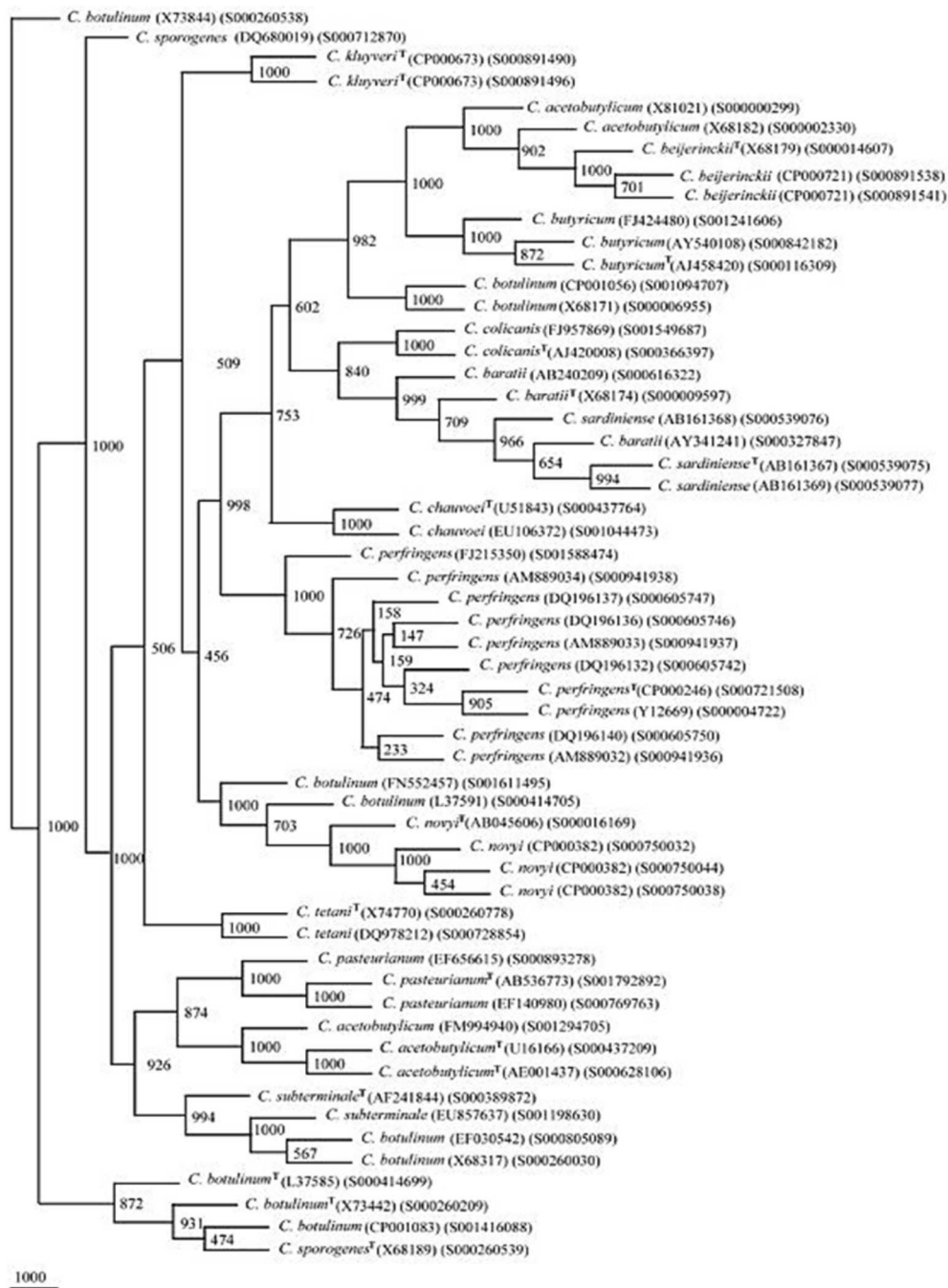


Figure 1. Relations phylogénétiques entre les espèces de *Clostridium* sur la base de l'ARNr 16S (d'après Kalia et al., 2011). La phylogénie a été construite en utilisant la méthode de Neighbor-Joining, les valeurs de support de branches ont été obtenues avec 1000 bootstraps

1.2 Caractéristiques de l'espèce *C. perfringens*

Décrite pour la première fois en 1892 par Welch et Nuttall lors d'une autopsie humaine, cette bactérie est d'abord appelée *Bacillus aerogenes capsulatum*, puis *Clostridium welchii*,

pour prendre définitivement le nom actuel de *Clostridium perfringens* au début du xx^e siècle (Lucey and Hutchins, 2004). C'est un bacille pouvant mesurer 4 à 8 μm de long et 1 à 1,5 μm de large, non motile et pouvant croître à des pH allant de 5,5 à 8,0 ainsi qu'à une température comprise entre 20 °C et 50 °C (optimale, 37 °C) (Li and McClane, 2006). Sur gélose au sang, les colonies sont circulaires, bombées, grises à jaune-gris, transparentes avec une surface brillante. *C. perfringens* produit une double zone d'hémolyse caractéristique permettant de l'identifier : une première zone de lyse complète (hémolyse β) due à la toxine θ , et une deuxième zone de lyse incomplète (hémolyse α) due à la toxine alpha. D'autres morphologies peuvent aussi être détectées : soit des colonies rugueuses au contour en lobes, soit des colonies plates à la surface irrégulière et au contour filamenteux (Wüst et al., 2011). D'autres milieux de cultures microbiologiques sélectifs comme le milieu Tryptone-Sulfite-Cyclosérine (TSC) et le milieu Shahidi-Ferguson-Perfringens (SFP) peuvent également être utilisés pour l'isolement de *C. perfringens*. Le milieu TSC contient de la D-cyclosérine et le milieu SFP contient de la kanamycine et de la polymyxine B pour la sélection de *C. perfringens*, ainsi qu'une émulsion de jaunes d'œuf pour détecter la production de la lécithinase (Brazier et al., 2002). Les colonies de *C. perfringens* sur ces milieux sont noires, dues à la production de H_2S , et entourées d'une zone de précipitation indiquant la production de la lécithinase (**Figure 2**). *C. perfringens* sporule rarement *in vitro* dans les milieux usuels de microbiologie. Cependant, elle sporule plus facilement dans les intestins et le sol (de Jong et al., 2002). Lorsqu'elles sont présentes, les spores de *C. perfringens* sont résistantes aux conditions de stress, notamment à la chaleur, aux désinfectants et à la lumière ultraviolette (Yang et al., 2009).

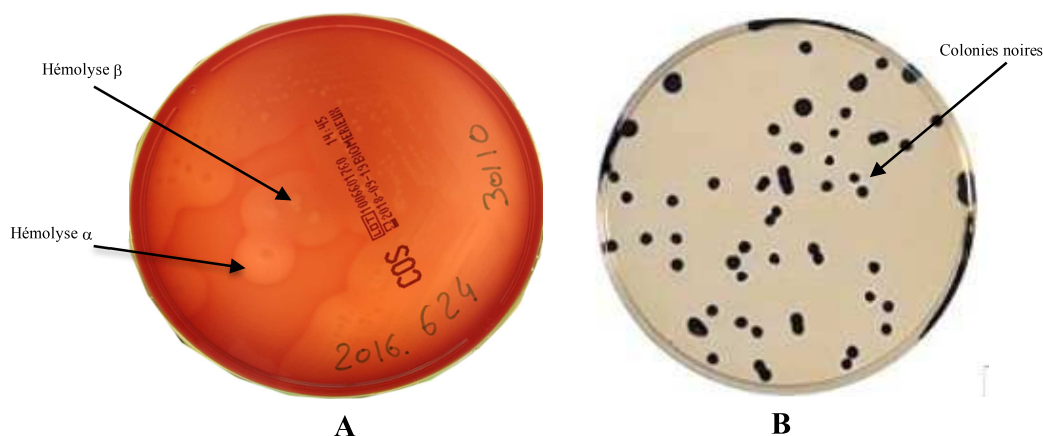


Figure 2. Colonies de *C. perfringens* sur gélose au sang (A) : colonies circulaires avec une double hémolyse α et β ; sur gélose TSC (B) : colonies noires en raison de la production de H_2S du à la réduction du sulfite de fer

C. perfringens est ubiquitaire dans l'environnement. Ce microorganisme peut être également retrouvé dans le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux (Petit et al., 1999). Sa capacité à former des spores en conditions de stress lui confère une plus grande résistance lui permettant de vivre dans de nombreuses niches environnementales, notamment le sol et les eaux usées (Li et al., 2016a). *C. perfringens* peut aussi être retrouvé dans les aliments et ainsi causer des toxi-infections alimentaires (Nowell et al., 2010).

1.3 Classification de *C. perfringens* en fonction du toxinotype

La virulence de *C. perfringens* est largement attribuée à sa capacité à produire un grand nombre de facteurs protéiques sécrétés (Li et al., 2013a). Parmi ces facteurs sont retrouvées des toxines et des enzymes hydrolytiques (Uzal et al., 2014a). Par leurs actions néfastes sur les cellules de l'hôte, ces facteurs protéiques sont à l'origine des différentes pathologies causées par *C. perfringens* (Petit et al., 1999). Classiquement, les souches de *C. perfringens* sont réparties en cinq toxinotypes (A à E) sur la base de la production de quatre toxines majeures, CPA, CPB, ETX, ITX, comme indiqué dans le **tableau 1** (Petit et al., 1999).

Tableau 1. Classification de *C. perfringens* sur la base de la production des toxines

Toxinotype	Toxine produite			
	α -toxine (CPA)	β -toxine (CPB)	ϵ -toxine-(ETX)	ι -toxine (ITX)
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+
Gène	<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>ia/ib</i>
Localisation	chromosome	plasmide	plasmide	plasmide

(+) = production de la toxine, (-) = absence de production de la toxine

Le toxinotype A est le plus répandu dans la nature et présent dans le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux (Freedman et al., 2015). Il est également le plus associé à la pathogénicité chez l'Homme et les animaux (Petit et al., 1999). La toxine α est la principale toxine produite par les souches de toxinotype A (Li et al., 2013 ; Sawires et Songer, 2006). Outre la toxine α qui est produite par tous les toxinotypes, les souches de toxinotype B

produisent les toxines β et ϵ , les souches de toxinotype C produisent la toxine β , les souches de toxinotype D produisent la toxine ϵ et les souches de toxinotype E produisent la toxine ι (Freedman et al., 2015). Les toxinotypes B, C, D et E sont associés à des entérites et des entérotoxémies principalement chez les animaux et rarement chez l'Homme (Petit et al., 1999). Le **tableau 2** montre les principales maladies causées par les cinq toxinotypes de *C. perfringens*.

Tableau 2. Principales maladies associées aux toxinotypes de *C. perfringens*

Toxinotype	Principales maladies
A	Intoxication alimentaire (humain)
	Gangrène gazeuse (humain)
	Entérite nécrotique (volaille, porc)
	Entérite hémorragique jéjunale (bovin)
B	Entérotoxémie (mouton)
	Dysenterie (veau, agneau)
	Entérite (veau, poulain)
C	Entérite nécro-hémorragique (humain)
	Entérite nécrotique (volaille)
	Entérite (porcelet, veau, poulain, agneau naissant)
D	Entérotoxémie (veau, chèvre, agneau)
	Rein pulpeux (mouton)
E	Entérite nécro-hémorragique (veau)
	Entérotoxémie (veau)

Les gènes codants pour trois des quatre toxines utilisées dans la classification actuelle (β , ϵ et ι) sont localisés sur de grands plasmides (**Tableau 3**) (Petit et al., 1999 ; Canard et al., 1992). Plus récemment, il a été montré que ces plasmides portent le locus de conjugaison T_{cp} (*Transfer clostridial plasmid*) et sont donc susceptibles d'être conjugués (Freedman et al., 2016). En effet, le transfert conjugatif de plasmide portant le gène *etx* d'une souche de toxinotype D à une souche de toxinotype A a été démontré, conduisant à la conversion d'une souche de type A en type D (Hughes et al., 2007). Les nombreuses études réalisées sur *C. perfringens* au cours des dernières années ont permis l'identification de nouvelles toxines (Keyburn et al., 2008). Cette découverte de nouvelles toxines apporte une nouvelle dimension à la caractérisation du microorganisme, rendant le schéma actuel de la classification dépassé (Li et al., 2013). Ainsi, une récente étude a apporté une révision à la classification de *C. perfringens* pour inclure deux nouveaux toxinotypes F et G incluant les souches produisant

respectivement la *C. perfringens* entérotoxine (CPE) et la *Necrotic enteritis B-like toxin* (NetB) comme indiqué dans le tableau ci-dessous (Rood et al., 2018).

Tableau 3. Nouvelle classification de *C. perfringens* selon Rood et al. (2018)

Toxinotype	Toxine produite					
	CPA-toxine	CPB-toxine	ETX-toxine	ITX-toxine	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	±	-
D	+	-	+	-	±	-
E	+	-	-	+	±	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+
Gène	<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>ia/ib</i>	<i>cpe</i>	<i>NetB</i>
Localisation	chromosome	plasmide	plasmide	plasmide	plm/ch m	plasmid e

(+) = production de la toxine, (-) = absence de production de la toxine, plm : plasmide, chm : chromosome.

La nouvelle classification de *C. perfringens* est donc basée sur la production six toxines. Ces toxines sont les plus impliquées dans les manifestations gastro-intestinales chez l'Homme et chez les animaux (Uzal et al., 2010).

1.4 Les facteurs de virulence de *C. perfringens*

Le nombre de facteurs de virulence de *C. perfringens* mis en évidence a considérablement augmenté ces dernières années avec en particulier l'utilisation des nouvelles technologies de séquençage à haut débit. Plus de vingt facteurs de virulence sont actuellement décrits dans la littérature (Kiu and Hall, 2018). Cependant, une confirmation expérimentale de leurs rôles dans la virulence reste encore à établir (Revitt-Mills et al., 2015). Leur mode d'action comprend la déstabilisation des membranes cellulaires qui perturbent la perméabilité des cellules cibles, la formation de pores membranaires et l'altération du cytosquelette cellulaire (Petit et al., 1999). Le contenu en facteurs de virulence varie d'une souche à l'autre et aucune souche de *C. perfringens* susceptible de synthétiser tous les facteurs de virulence connus n'a été décrite à ce jour (Li et al., 2013). Le **tableau 4** récapitule

les facteurs de virulence, leur mode d'action sur les cellules de l'hôte ainsi que la localisation génomique de leurs gènes.

Tableau 4. Propriétés des facteurs de virulence de *C. perfringens* connus à ce jour (Kiu et al., 2018)

Facteur de virulence	Gène	Localisation	Activité biologique
Alpha-toxine	<i>cpa</i>	Chromosome	Phospholipase C, sphingomyélinase
Beta-toxine	<i>cpb</i>	Plasmide	Toxine formant un pore
Beta2-toxine	<i>cpb2</i>	Plasmide	Toxine formant un pore
Epsilon-toxine	<i>etx</i>	Plasmide	Toxine formant un pore
Iota-toxine	<i>iap/ibp</i>	Plasmide	Actine ADP-ribosyl-transférase
Entérotoxine	<i>cpe</i>	Plasmide/chromosome	Toxine formant des pores
BEC-toxine	<i>becA/becB</i>	Plasmide	Actine ADP-ribosyl-transférase
Thêta-toxine/PFO	<i>pfoA</i>	Chromosome	Cytosine cholestérol dépendante
TpeL-toxine	<i>tpeL</i>	Plasmide	Mono-glycosyl transférase
NetB-toxine	<i>netB</i>	Plasmide	Toxine formant un pore
Kappa-toxine	<i>colA</i>	Chromosome	Collagénase
Lambda-toxine	<i>lam</i>	Plasmide	Protéase
Delta-toxine	<i>cpd</i>	Plasmide	Toxine formant un pore
Mu-toxine	<i>nagH</i>	Chromosome	Hyaluronidase
NanH	<i>nanH</i>	Chromosome	Sialidase
NanI	<i>nanI</i>	Chromosome	Sialidase
NanJ	<i>nanJ</i>	Chromosome	Sialidase
Uréase	<i>ureABC</i>	Chromosome	Uréases
cadA	<i>cadA</i>	Chromosome	Désoxyribonucléase
NetE-toxine	<i>netE</i>	Plasmide	Toxine formant un pore
NetF-toxine	<i>netF</i>	Plasmide	Toxine formant un pore
NetG-toxine	<i>netG</i>	Plasmide	Toxine formant un pore

1.4.1 Toxines formant un pore

Les toxines formant un pore (PFTs) sont des protéines produites par toutes les classes de microorganismes y compris les bactéries et les champignons (Alouf, 2003). Elles ciblent les membranes des cellules hôtes et provoquent leur lyse. Certaines toxines s'oligomérisent une fois associées ou insérées dans la membrane (Parker et Feil, 2005). Selon leur structure, les PFTs peuvent être divisées en deux classes : les α -PFTs et les β -PFTs (Popoff, 2014). Les α -PFTs possèdent un domaine structuré en hélice α alors que les β -PFTs sont riches en feuillets β et contiennent peu de résidus hydrophobes dans leur structure primaire (Parker et Feil, 2005). Plus d'un tiers des toxines connues de *C. perfringens* appartiennent à la famille des toxines formant des pores (Popoff and Bouvet, 2009) et plus particulièrement à la famille β -PFTs (Popoff, 2014). La **figure 3** décrit le mécanisme par lequel les β -PFTs s'oligomérisent et forment un pore membranaire.

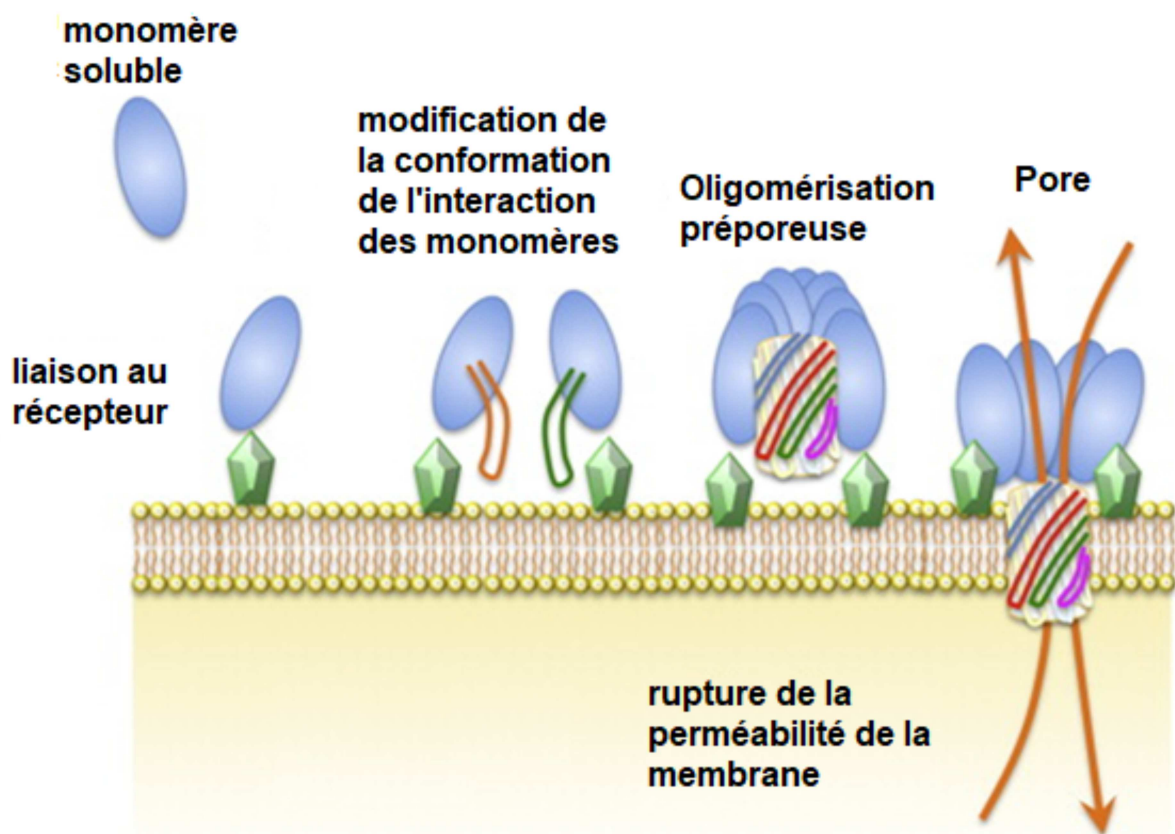


Figure 3. Modèle général du mécanisme d'action des β -PFTs (Popoff, 2014). Les bactéries produisent les toxines sous forme de monomères solubles. Celles-ci reconnaissent les récepteurs membranaires des cellules cibles et se lient à eux, s'oligomérisent et forment un pré-pore qui s'insère dans la membrane.

1.4.1.1 Toxine Beta (β ou CPB)

Codée par le gène *cpb* qui est localisé sur de grands plasmides allant de 65 à 110 kb, la toxine β ou CPB est une toxine formant des pores et appartenant à la famille β -PFTs (Theoret et al., 2015 ; Gurjar et al., 2010). Elle est sécrétée sous forme de protéine monomérique d'un poids moléculaire de 35 kDa (Autheman et al., 2013). La toxine CPB est produite lors de la phase de croissance végétative par les souches de toxinotypes B et C de *C. perfringens* (Cavalcanti et al., 2004). Elle possède les mêmes caractéristiques biologiques que les toxines α , la toxine γ et la leucocidine de *Staphylococcus aureus* avec lesquelles elles partagent respectivement 28 %, 22 % et 28 % de similarité en acides aminés (Autheman et al., 2013). La toxine CPB est inactivée par la trypsine et les autres protéases. En raison de cette sensibilité, la CPB n'est active qu'en présence d'inhibiteurs de la trypsine *in vitro* et *in vivo* (Uzal et al., 2010). Cependant, il existe des variantes de la toxine CPB qui possèdent différentes sensibilités à la trypsine et une activité cytotoxique *in vitro* (Theoret et al., 2015).

Les pathologies associées à la toxine CPB se caractérisent par une hémorragie et une nécrose de la muqueuse intestinale (Diab et al., 2016). En effet, la toxine crée des pores sélectifs pour les cations monovalents dans les membranes cellulaires et provoque l'efflux des ions potassium (K^+) et sodium (Na^+), entraînant ainsi un dérèglement de l'équilibre électrolyte normal (Freedman et al., 2016). Il en résulte donc la mort rapide des cellules par nécrose de (Autheman et al., 2013).

1.4.1.2 Toxine Beta2 (β_2 ou CPB2)

Longtemps confondue avec la toxine β à cause de sa sensibilité à la trypsine et son activité limitée à certains types des cellules pour induire l'entérite nécrotique, la toxine β_2 ou CPB2 fut purifiée et identifiée à partir d'une souche de *C. perfringens* isolée d'un porc atteint de la forme typique d'entérite hémorragique néonatale (Gibert et al., 1997). Le gène *cpb2* codant pour cette toxine est localisé sur des plasmides de différentes tailles allant de 48 à 110 kb (Li et al., 2013). Ce gène code pour une protéine de 28 kDa dont la séquence en acides aminés ne présente que 15 % de similarité avec celle de la toxine CPB (Theoret et al., 2015). Bien que le gène *cpb2* ait été initialement identifié dans les isolats de *C. perfringens* de type C, d'autres auteurs ont montré sa présence dans le toxinotype A (Jost et al., 2006 ; Waters et al., 2003). Deux allèles principaux (consensus et atypique) du gène *cpb2* ont été décrits (van Asten et al., 2010). L'allèle *cpb2* consensus est présent principalement dans les isolats de *C.*

perfringens d'origine porcine, alors que l'allèle atypique prédomine dans les isolats d'origine non porcine (Gibert et al., 1997). En outre, l'allèle *cpb2* atypique n'est exprimé que dans 50 % des cas s'il est présent, alors que dans la plupart des souches porcines (97 %) le *cpb2* consensus est exprimé (Popoff et Bouvet, 2013 ; Jost et al., 2006). Le mode d'action de la toxine CPB2 est mal défini à ce jour, mais celle-ci aurait les mêmes effets que la toxine CPB. En effet, la toxine CPB2 a été découverte suite à l'identification d'une protéine de poids moléculaire différent de la toxine CPB mais qui induisait les mêmes signes que cette dernière (Li et al., 2013 ; Gibert et al., 1997). Cependant, le gène codant pour CPB2 a été également détecté dans les isolats du microbiote intestinal des animaux sains (Freedman et al., 2015). Cela complique la tâche pour tirer des conclusions sur le rôle exact de CPB2.

1.4.1.3 Toxine epsilon (ϵ ou ETX)

Seules les souches appartenant aux toxinotypes B et D sont porteuses du gène *etx* codant pour la toxine ϵ . Ce gène est localisé sur un plasmide de 65 kb dans les deux toxinotypes (Sayeed et al., 2007). La toxine ϵ est produite en phase exponentielle de croissance et libérée d'abord sous forme de protoxine peu active de 32 kDa, qui est transformée par la suite en une protéine active, 1 000 fois plus toxique que la protoxine (Uzal et al., 2014). L'activation se fait par des protéases intestinales produites par l'hôte, comme la trypsine, la chymotrypsine et une métallo-protéase appelée lambda-toxine, produite par certaines souches de *C. perfringens* (Uzal et al., 2014 ; Harkness et al., 2012). Les protéases clivent 13 acides aminés de l'extrémité N-terminale et 29 acides aminés de l'extrémité C-terminale. L'élimination de ces acides aminés est essentielle pour la production de la toxine active car ces résidus bloquent l'oligomérisation de la toxine (Robertson et al., 2011). L'action de la toxine ϵ commence par la liaison à son récepteur cellulaire qui est le HAVCR1 (Ivie et al., 2011), oligomérisé et forme un pré-pore heptamérique (Popoff, 2011). Après oligomérisation, le domaine formant le pore s'insère dans la membrane cellulaire de l'hôte, provoquant une fuite des ions potassium (K^+) intracellulaires, une augmentation des ions chlorures (Cl^-) et sodium (Na^+) avec un afflux d'ions calcium (Ca^{2+}) (Stiles et al., 2013). Il en résulte un gonflement et une perte de viabilité de la cellule. Récemment, il a été démontré que la cytotoxicité de la toxine ϵ *in vitro* est corrélée avec son activité *in vivo*, et notamment les effets létaux correspondent à sa capacité à traverser la barrière encéphalique et à exercer une activité cytotoxique (Dorca-Arévalo et al., 2014). La toxine ϵ diffère des autres toxines formant

des pores produites par *C. perfringens* par son activité létale à faible dose (70 ng/kg) et sa spécificité pour les cellules neuronales (Bokori-Brown et al., 2011). Cette spécificité est susceptible de refléter sa capacité à se lier à des récepteurs cellulaires spécifiques qui n'ont pas été identifiés à ce jour (Li et al., 2013).

En France, la toxine ϵ est répertoriée dans le groupe des MOT, microorganismes et toxines hautement pathogènes, dont la détention, la mise en œuvre et la cession sont soumises à autorisation auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) à cause de leur risque pour la santé et la sécurité humaine.

1.4.1.4 *Clostridium perfringens* entérotoxine (CPE)

Contrairement aux autres toxines décrites précédemment, la CPE est produite uniquement au cours de la sporulation (McClane et al., 2013). Le gène *cpe* codant pour cette toxine peut être localisé sur le chromosome ou sur un plasmide (McClane, 2003). D'après Brynestad et Granum (2002), le locus *cpe* chromosomique est associé à trois séquences d'insertion (IS) : une *IS1469* située à 1,3 kb en amont du gène *cpe*, et deux *IS1470* flanquant le gène *cpe* (Li et al., 2010). La séquence d'insertion *IS1470* est située à 3 kb en amont, et à 1,2 kb en aval du gène *cpe* (Brynestad et Granum, 2002) (**Figure 4**).



Figure 4. Organisation génétique du locus *cpe* chromosomique chez les souches de *C. perfringens* de type A (d'après Miyamoto et al., 2002).

La CPE est produite principalement par les souches de toxinotype F (**Tableau 3**) anciennement connues sous le nom de toxinotype A producteur de la CPE (McClane et al., 2013 ; Rood et al., 2018). Des souches appartenant aux toxinotypes C et D, productrices de la CPE, sont également fréquentes (Billington et al., 1998). Les souches de toxinotype E possèdent un gène *cpe* silencieux ou produisent une variante de la CPE (Miyamoto et al., 2011). La protéine CPE est constituée d'une seule chaîne polypeptidique contenant 319 acides aminés (Freedman et al., 2016). Le domaine C-terminal intervient dans la liaison de la CPE à son récepteur cellulaire, les claudines, qui sont des protéines importantes des jonctions serrées (Chen et al., 2014). Le mécanisme d'action de CPE décrit récemment par Navarro et al. (2018) indique que plusieurs complexes CPE-claudines se forment pour créer de larges

complexes moléculaires de 450 kDa. La toxine présente dans ce complexe de 450 kDa s'intégrerait partiellement dans la membrane plasmidique grâce au domaine N-terminal, formant ainsi des pores (Navarro et al., 2018 ; Veshnyakova et al., 2010). La **figure 5** présente un modèle du mécanisme d'action de la CPE selon Navarro et al. (2018). La CPE cause donc un dérèglement de l'équilibre électrolytique et conduit à la mort des cellules affectées par une élévation du Ca^{2+} intracytoplasmique et une diminution de K^+ intracellulaire (Chen et al., 2014). Au niveau intestinal, elle cause une perte de liquide et une nécrose de l'épithélium atteint. La CPE exerce donc une activité cytotoxique, entérotoxique et létale (Kitadokoro et al., 2011).

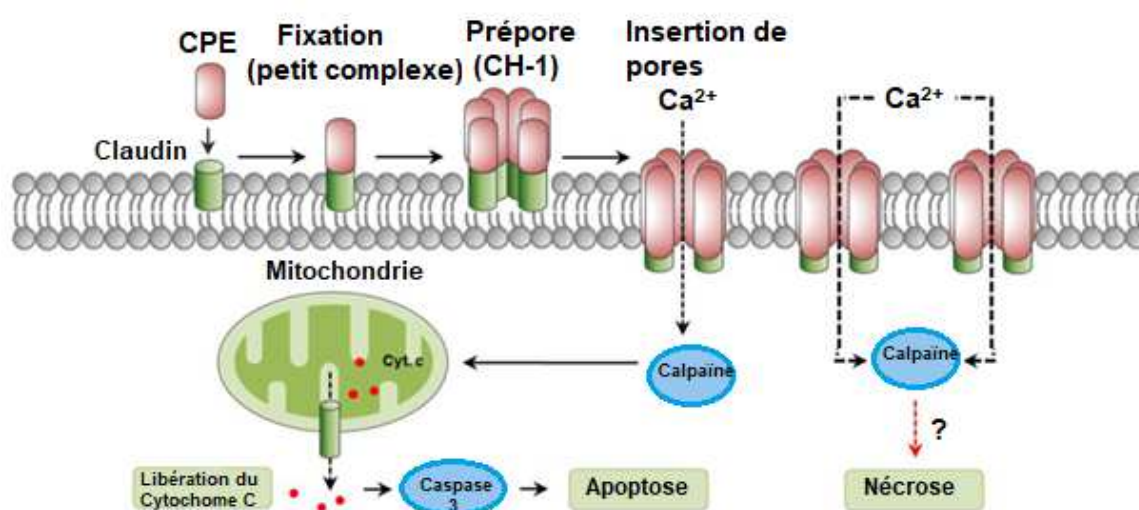


Figure 5. Mécanisme d'action de la CPE selon Navarro et al. (2018) . La liaison initiale de la CPE aux claudines entraîne la formation d'un petit complexe. L'interaction de six petits complexes conduit à une oligomérisation de la CPE et la formation d'un pré-pore puis d'un pore sur la membrane plasmique. Il se produit alors un influx de Ca^{2+} , qui stimule l'activité des calpaïnes, ce qui à son tour entraîne l'activation de la caspase-3 et l'apoptose avec des caractéristiques de nécrose.

1.4.1.5 Necrotic Enteritis Toxin B-Like (NetB)

Selon le nouveau schéma de la classification de *C. perfringens*, la toxine NetB est produite par les souches de toxinotype G (Rood et al., 2018). C'est un facteur de virulence retrouvé dans les cas d'entérites nécrotiques chez la volaille (Keyburn et al., 2008). La toxine NetB a été découverte suite à la création d'un mutant ne produisant pas la toxine α (Keyburn et al., 2006). Elle est produite sous forme d'une protéine de 323 acides aminés (Gurjar et al., 2010). Après le clivage de la séquence signal, la protéine mature a un poids moléculaire de

33 kDa. La toxine NetB partage 38 % d'homologie avec la toxine CPB de *C. perfringens*, 30 % avec les toxines α -hémolysine de *Staphylococcus aureus* et CytK de *Bacillus cereus* (Bannam et al., 2006). Comme les autres toxines formant des pores, la toxine NetB est produite sous forme monomérique, s'oligomérisse à la surface de la membrane de l'hôte, et s'insère dans la membrane pour former des pores de 1,6 à 1,8 nm de diamètre (Savva et al., 2013). La formation de pores entraîne l'efflux des ions K^+ et l'influx des ions Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- , conduisant à la lyse osmotique de la cellule (Keyburn et al., 2008 ; Bannam et al., 2006).

1.4.1.6 Toxine thêta (θ ou PFO)

La toxine thêta, appelée aussi perfringolysine O (PFO), peut être produite par tous les toxinotypes de *C. perfringens* (Agi Deguchi et al., 2009). Le gène *pfoA* codant pour la toxine θ est retrouvé sur le chromosome à environ 250 kb de l'origine de réplication (Shimizu et al., 2002). La séquence primaire de la toxine θ déduite de la séquence du gène révèle une protéine native de 494 acides aminés de laquelle un peptide signal de 28 acides aminés est libéré au moment de la sécrétion. La protéine mature a un poids moléculaire de 51 kDa (Tweten, 2005). La toxine θ appartient à la famille des cytolysines dépendantes du cholestérol (CDC), qui comprend les toxines produites par de nombreuses bactéries à Gram positif telles que la lystériolysine de *Listeria monocytogenes* et la streptolysine de *Streptococcus pyogenes* (Tweten, 2005). Ces toxines nécessitent des concentrations élevées en cholestérol pour pouvoir s'insérer dans la membrane cellulaire et former des pores (Alouf, 2003). Suite à la liaison de la toxine à son récepteur cellulaire, une oligomérisation a été observée, formant un pré-pore qui pouvait contenir jusqu'à 50 monomères. En se formant sur la membrane plasmique, la toxine induit une lyse cellulaire par des mécanismes osmotiques (Popoff, 2014). La toxine θ est associée aux lésions de la gangrène gazeuse par la destruction de tissus. Elle agit de manière synergétique avec la toxine α dans la destruction des membranes cellulaires (Yasugi et al., 2015). En effet, en utilisant des souches mutantes du gène *pfoA*, un effet synergique entre la toxine θ et la toxine α a été mis en évidence dans la gangrène gazeuse expérimentale (Awad et al., 2000).

1.4.1.7 Toxine delta (δ)

La toxine delta (δ) est une hémolysine produite par les souches de toxinotypes B et C de *C. perfringens* (Seike et al., 2016). C'est une protéine basique de 32 kDa composée de 318

acides aminés dont un peptide signal de 28 résidus (Manich et al., 2008). La toxine δ est codée par le gène *cpd* qui est localisé sur un plasmide et flanqué par deux séquences d'insertion indiquant sa capacité à être transféré entre les souches de *C. perfringens* (Manich et al., 2008). La toxine δ présente une importante homologie avec la toxine $\beta 1$ (43 % d'identité) et la toxine NetB (40 % d'identité) de *C. perfringens*, ainsi qu'avec d'autres toxines formant des pores, dont la toxine α (32 % d'identité) et les leucocidines (32 % d'identité) de *Staphylococcus aureus* (Seike et al., 2016). La toxine δ est produite sous forme de monomères qui reconnaissent des récepteurs membranaires à la surface de la cellule cible et s'assemblent en oligomères (Manich et al., 2008). Il a été démontré que la toxine δ induisait l'hémolyse de divers types cellulaires mais le mécanisme d'induction de la cytotoxicité reste à élucider. La toxine δ hémolyse les érythrocytes des porcs, des chèvres et des moutons (Seike et al., 2016). Elle est également cytotoxique pour d'autres types cellulaires, dont les monocytes et les plaquettes humains (Huyet et al., 2013). La cytotoxicité sélective de la toxine δ est due à son attachement spécifique au ganglioside GM2, dérivé de glycosphingolipides retrouvés abondamment au niveau des cellules du système nerveux. Il a été démontré que l'activité hémolytique ainsi que l'attachement spécifique de la toxine aux érythrocytes peuvent être inhibés par la présence de ganglioside GM2 (Popoff et Bouvet, 2009). L'effet cytotoxique de la toxine serait dû à la formation de pores anioniques au niveau de la membrane cellulaire. Ces pores d'environ 10 nm de diamètre seraient causés par la forme heptamérique de la toxine (Manich et al., 2008).

1.4.2 Les toxines de *C. perfringens* à activités hydrolytiques – Hydrolases

1.4.2.1 Toxine alpha (α ou CPA)

La toxine α ou CPA est une métallo-enzyme, associée au zinc, possédant une activité phospholipase C, une activité sphingomyélinase et une activité lécithinase (Petit et al., 1999). Elle hydrolyse les phospholipides de la membrane de plusieurs types cellulaires, dont les érythrocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires (Goossens et al., 2017). Le gène *cpa* codant pour cette toxine est localisé sur le chromosome, près de l'origine de réplication *OriC*, qui est l'une des régions les plus stables du chromosome chez tous les toxinotypes (Uzal et al., 2010). Ceci pourrait refléter le rôle essentiel de la toxine α dans la vie de *C. perfringens*. La protéine est composée de 370 acides aminés et possède un poids

moléculaire de 40 kDa (Goossens et al., 2017). Elle comprend un domaine catalytique, à l'extrémité N-terminale, ainsi qu'un domaine de liaison à la double couche de phospholipides, à son extrémité C-terminale (Oda et al., 2015). La toxine α semble être la toxine principale produite par *C. perfringens* et causant les infections histotoxiques (Awad et al., 2000). Cependant, son rôle dans les maladies gastro-intestinales reste controversé et fortement débattu (Goossens et al., 2017). Un possible rôle synergique de la toxine α avec d'autres facteurs de virulence de *C. perfringens* a été suggéré par certains auteurs (Titball et al., 1999). Jusqu'à présent ces facteurs de virulence ne sont pas encore bien connus, mais il existe des preuves indirectes impliquant certaines toxines et enzymes hydrolytiques comme la toxine PFO (Yasugi et al., 2015).

1.4.2.2 Toxine kappa (κ) collagénase

C. perfringens produit diverses enzymes collagénolytiques avec des masses moléculaires allant de 80 à 120 kDa (Pruteanu et al., 2010). Historiquement, la collagénase de masse moléculaire de 80 kDa est la plus étudiée (Matsushita et al., 1994). En effet, cette collagénase possède des activités hémorragiques, dermonécrotiques, et peut causer une destruction importante du tissu conjonctif suggérant un rôle potentiel dans la pathogénie de *C. perfringens* (Shimizu et al., 1994). Le collagène est largement distribué dans le corps et fait partie intégrante du tissu conjonctif et des membranes basales (Awad et al., 2000). La rupture du collagène par les collagénases bactériennes peut entraîner la perte de l'intégrité des tissus et une nécrose tissulaire subséquente (Goossens et al., 2018). Cependant une corrélation positive n'a pas été établie entre la virulence de *C. perfringens* et sa capacité à produire la collagénase, et l'anti-collagénase n'a pas empêché la survenue de la gangrène gazeuse expérimentale chez les cobayes (Obana et al., 2010).

À partir de 1994, la recherche est passée de la collagénase 80 kDa à la collagénase 120 kDa, et le terme toxine κ a commencé à être utilisé pour décrire la collagénase de 120 kDa (Obana et al., 2013). Le gène *colA* est présent chez toutes les souches de *C. perfringens*. Cette toxine pourrait jouer un rôle dans la virulence de *C. perfringens* en matière de propagation des toxines et des cellules bactériennes dans le tissu de l'hôte au cours de la nécrose tissulaire (Goossens et al., 2018). Awad et al. (2008) ont démontré, grâce à des mutants, que la toxine κ n'était pas un facteur de virulence majeur dans les cas de myonécroses. Le rôle de la κ -toxine de *C. perfringens* dans les maladies intestinales n'est pas encore exploré. Cependant, celle-ci

est probablement impliquée dans de multiples stades de l'entérite nécro-hémorragique (Goossens et al., 2018).

1.4.2.3 Toxine lambda (λ)

La toxine lambda (λ) ou caséinase est une métallo-protéase produite par les souches de toxinotypes B et E de *C. perfringens* (Jin et al., 1996). Certaines souches de toxinotypes D sont également connues comme productrices de cette toxine (Sayeed et al., 2007). La toxine λ est codée par le gène *lam*, retrouvé sur un plasmide de 70 kb, qui code pour une protéine de 36 kDa (Matsushita et al., 1994). Elle est sécrétée comme une proenzyme contenant une longue séquence précurseur de 200 acides aminés. La protéine mature contient le motif HEXXH de liaison au zinc et des séquences consensus retrouvées au sein de la famille des protéases thermolysines (Jin et al., 1996). La toxine λ contribue à la virulence de *C. perfringens* par la dégradation de composants protéiques de la membrane des cellules de l'hôte. Elle peut ainsi dégrader le collagène, la fibronectine, le fibrinogène, l'immunoglobuline A ainsi que le composant C3 du complément. Elle contribue également à l'activation d'autres toxines comme la toxine ϵ (Harkness et al., 2012). Il a été démontré que lorsque la toxine λ est injectée par voie intradermique chez la souris, elle provoque une dégradation du tissu conjonctif (Harkness et al., 2012). Toutefois, son mode d'action exact dans la virulence de *C. perfringens* reste encore à déterminer.

1.4.2.4 Toxine mu (μ ou NagH)

De nombreuses bactéries produisent des substances extracellulaires qui leur permettent de se propager dans le tissu de l'hôte (Sirous et al., 2009). Ces produits sont appelés facteurs de propagation et sont considérés également comme des facteurs de virulence car ils facilitent la propagation des bactéries pathogènes ou leurs toxines à travers les tissus de l'hôte (Goossens et al., 2018). Les hyaluronidases produites par des bactéries Gram-positive comme *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *C. perfringens*, sont considérées comme des facteurs de propagation (Hynes et Walton, 2000). Peu de recherches ont été effectuées sur les hyaluronidases de *C. perfringens*. L'enzyme la plus étudiée est la toxine μ ou NagH (Canard et al., 1992). Celle-ci dégrade l'acide hyaluronique en glucosamine (Chitayat et al., 2008). L'acide hyaluronique est un constituant majeur de la matrice extracellulaire, en particulier des tissus conjonctifs. Il forme une solution visqueuse qui fournit une résistance à

la pénétration des agents infectieux (Girish et Kemparaju, 2007). La dégradation de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase diminue sa viscosité, ce qui augmente la perméabilité des tissus conjonctifs et augmente potentiellement la propagation de toxines de *C. perfringens* (Goossens et al., 2017). La toxine μ peut être produite par les souches appartenant aux cinq toxinotypes de *C. perfringens*. Son poids moléculaire est de 114 kDa. Elle comprend un domaine catalytique en N-terminal de 700 acides aminés et un domaine C-terminal de 300 résidus d'acides aminés (Kreil, 1995). Elle est codée par le gène *nagH* qui est localisé sur le chromosome à moins de 30 kb du gène *colA* (Obana et al., 2010). Aucune preuve expérimentale n'existe actuellement sur le rôle réel de cette toxine dans les infections intestinales à *C. perfringens* (Hynes et Walton, 2000).

1.4.2.5 Toxine nu (ν)

La toxine ν est une nucléase qui pourrait correspondre à une endonucléase extracellulaire récemment identifiée comme facteur de virulence (Shimizu et al., 2002). La protéine a un poids moléculaire de 67 kDa. Elle est très instable et peut être inhibée par des ions divalents comme le cuivre et le zinc ainsi que le citrate de sodium (Okumura et al., 2005). Le gène codant pour cette toxine est *cadA* qui est localisé sur le chromosome et présent dans tous les toxinotypes de *C. perfringens*. La seule information disponible qui décrit l'activité de la toxine ν concerne son implication dans la propagation de *C. perfringens* liées myonécroses en dégradant l'ADN dans les tissus nécrosants (Okumura et al., 2005).

1.4.2.6 Sialidases

Les sialidases, appelées également neuraminidases, sont des enzymes qui hydrolysent la liaison α des acides sialiques portés par les récepteurs des cellules (Severi et al., 2007 ; Lewis et Lewis, 2012). Les sialidases sont produites par plusieurs bactéries pathogènes parmi lesquelles *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* et *C. perfringens* (Li et al., 2016). Les sialidases peuvent jouer un rôle nutritionnel pour le microbiote et les bactéries pathogènes, mais elles peuvent également agir comme facteurs de virulence au cours de l'expression du pouvoir pathogène bactérien (Rohmer et al., 2011).

Trois sialidases, nommées NanH, NanI, et NanJ, ont été décrites chez *C. perfringens* (Hiscox et al., 2013). Elles sont codées respectivement par les gènes *nanH*, *nanI* et *nanJ* (Li et al., 2011). NanH est une petite sialidase de 43 kDa dépourvue de peptide signal de sécrétion

et donc localisée dans le cytoplasme, alors que NanI et NanJ, considérées comme de grandes sialidases (respectivement 77 kDa et 129 kDa), sont sécrétées (Li et al., 2016). Au niveau nucléotidique, le gène *nanH* possède 19 % d'identités avec *nanI* et *nanJ*. Les deux exo-enzymes NanI et NanJ possèdent 57 % d'identités (Chiarezza et al., 2009). Alors que la petite sialidase ne possède qu'un domaine catalytique, NanI possède un domaine N-terminal catalytique ainsi qu'un domaine C-terminal de liaison aux glucides. NanJ est composée d'un domaine N-terminal catalytique et de cinq domaines C-terminaux accessoires dont les fonctions ne sont pas connues (Li et al., 2016). Il a été démontré expérimentalement que les grandes sialidases (NanI et NanJ) pouvaient augmenter les effets cytotoxiques de la toxine α (Hiscox et al., 2013). De plus, NanI pourrait contribuer à la colonisation intestinale des souches de *C. perfringens*. En effet, Li et al. (2011) ont démontré dans un modèle que lors d'une infection intestinale due à *C. perfringens* de type D, la trypsine activait NanI qui, par la suite, augmenterait l'activité de la toxine ϵ et permettrait l'adhérence intestinale de *C. perfringens*.

1.4.2.7 Uréases

Les uréases sont des métallo-enzymes contenant du nickel largement répandues dans le monde vivant (Wu et al., 2006). Elles hydrolysent l'urée en ammoniac et en carbamate (Petit et al., 1999). Les uréases sont synthétisées par des eucaryotes (champignons et levures) et par de nombreux procaryotes (eubactéries et archéobactéries) (Osaki et al., 2008). Cette fréquence élevée dans la nature des organismes urolytiques est due au caractère ubiquiste de l'urée (Dupuy et al., 1997).

C. perfringens produit une uréase composée de trois sous-unités (UreA, UreB et UreC) codées par l'opéron *ureABC*. Ce dernier est localisé sur des plasmides qui pourraient porter également d'autres facteurs de virulence comme la CPE, la toxine ι ou la toxine ϵ (Li et al., 2007). Environ 2 % des souches de *C. perfringens* de toutes origines possèdent les gènes codants pour les uréases (Li et al., 2007). Outre son rôle nutritif, l'uréase participe à la virulence des bactéries pathogènes, dont *C. perfringens*. Elle hydrolyse l'urée présente dans l'environnement gastrique en permettant la production d'ammoniac et de dioxyde de carbone (CO_2). L'ammoniac produit par l'hydrolyse de l'urée capte un proton pour former l'ammonium. La production de l'ammonium participe à la destruction de la barrière épithéliale pour permettre à *C. perfringens* de récupérer des nutriments essentiels (Sayeed et al., 2007).

1.4.3 Toxines à activités ADP ribosyl-transférases

1.4.3.1 Toxine iota (ι ou ITX)

C. perfringens de toxinotype E est le seul à produire la toxine ι ou ITX (Freedman et al., 2015). Cette dernière est une toxine binaire, c'est-à-dire qu'elle comporte deux sous-unités (Ia et Ib) nécessaires pour exercer sa toxicité (Sakurai et al., 2009). La sous-unité Ia est la composante enzymatique alors que la sous-unité Ib est la composante permettant l'attachement à la cellule cible (Morris et Fernández-Miyakawa, 2009 ; Gibert et al., 1997). Les deux sous-unités sont codées respectivement par les gènes *iap* et *ibp* qui sont séparés par 40 pb, et transcrits à partir d'un seul promoteur situé en amont du gène *iap* (Petit et al., 1999). Ces gènes sont localisés sur des plasmides de 95 à 135 kb (Sayeed et al., 2007). Les souches productrices de la toxine ITX sont associées à des entérites nécro-hémorragiques essentiellement chez le veau (Sakurai et al., 2009). La composante Ia est une NAD⁺ glycohydrolase et une ADP ribosyl-transférase (Sakurai et al., 2009). Son action est d'ADP-ribosyler l'actine des cellules pour la dépolymériser. Cela provoque une désorganisation des filaments d'actines, et par conséquent, une perte de la forme de la cellule (Chen et al., 2014 ; Morris et Fernández-Miyakawa, 2009). La composante Ib s'attache aux cellules et forme un pore heptamérique (Miyamoto et al., 2011 ; Morris et Fernández-Miyakawa, 2009). Cela permet l'efflux des ions K⁺ et l'influx des ions Na⁺, en plus de permettre l'entrée de la sous-unité Ia dans la cellule. La toxine ι a donc un effet entérotoxique, dermonécrotique et létal, et produit des dommages intestinaux visibles (Barth et Stiles, 2008).

1.4.3.2 Toxine TpeL

Récemment découverte dans les souches de toxinotypes A, B et C, la toxine TpeL est produite également en phase de sporulation de *C. perfringens* car le gène *tpeL* est exprimé pendant cette phase (Amimoto et al., 2007). La toxine TpeL fait partie des larges cytotoxines ou *Large Clostridial Cytotoxin* (Guttenberg et al., 2012). Ces dernières sont des exotoxines produites par certaines clostridies, notamment par les toxines A et B de *Clostridium difficile*, les toxines hémorragiques (TcsH) et létales (TcsL) de *Clostridium sordellii*, ainsi que par la toxine α de *Clostridium novyi* (Schirmer et Aktories, 2004). Elles ont un poids moléculaire variant entre 190 et 310 kDa (Just et Gerhard, 2004). La toxine TpeL est une protéine monocaténaire possédant quatre domaines : une extrémité N-terminale responsable de l'activité enzymatique de la glycosyl-transférase suivie d'un domaine de cystéine protéase

(Greco et al., 2006) ; un troisième domaine de liaison de la toxine à son récepteur ; et enfin, un dernier domaine responsable de la translocation de la toxine à l'intérieur du cytoplasme de la cellule cible (Genisyuerk et al., 2011). La toxine TpeL a des effets cytotoxiques menant à l'apoptose des cellules cibles (Guttenberg et al., 2012). Une étude portant sur le rôle de la toxine TpeL dans l'entérite nécrotique a été réalisée en comparant la virulence des souches possédant le gène *tpeL* avec des souches exemptes du gène, mais elle ne permet pas de conclure sur l'implication de la toxine TpeL dans la pathogénie de l'entérite nécrotique (Coursodon et al., 2012).

1.4.3.3 *Binary Enterotoxin of C. perfringens (BEC)*

La BEC, ou « *Binary Enterotoxin of C. perfringens* », a été récemment découverte par Yonogi et al. (2014) suite à une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) impliquant des souches de *C. perfringens*. Les souches isolées ne possédaient pas le gène *cpe* et la production de la toxine était négative au test de dosage de la CPE. Comme toutes les toxines binaires produites par *Clostridium* et *Bacillus* (iota, CDT et C2), la toxine BEC est composée de deux sous-unités : une sous-unité catalytique BECa possédant un poids moléculaire de 47 kDa et une sous-unité enzymatique BECb de poids moléculaire de 80 kDa (Kawahara et al., 2016 ; Yonogi et al., 2014). Les deux sous-unités ne possèdent aucune homologie de séquence avec la toxine CPE (Yonogi et al., 2016). La toxine BEC est produite pendant la phase de sporulation de *C. perfringens* (Stiles et al., 2016). Les gènes codants pour la toxine BEC (*becA* et *becB*) sont localisés sur un plasmide de 54,5 kb et contenant 55 cadres ouverts de lecture (ORFs), dont 39 codent pour des protéines d'origines inconnues (Yonogi et al., 2014). Les conditions de culture pour la production de la BEC sont identiques à celles utilisées pour la production de la CPE et impliquent un milieu spécifique utilisé pour la sporulation de *C. perfringens* comme le Duncan-Strong. La BEC agit en ribosylant les monomères d'actines G (Barth et Ernst, 2016). Cette ribosylation bloque la polymérisation de l'actine G en microfilament d'actine F (Davies et al., 2011). Cette perte de l'architecture structurale se traduit par une altération des jonctions intercellulaires avec une augmentation de la perméabilité des barrières épithéliales et endothéliales (Yonogi et al., 2014). Les essais réalisés en utilisant le surnageant de culture des souches productrices de la BEC et négatives à la CPE, montrent une accumulation de liquide dans l'anse intestinale ligaturée de lapin (Stiles et al., 2016).

CHAPITRE 2. SPORULATION ET INFECTIONS CHEZ *C. PERFRINGENS*

2.1. Spores

C. perfringens peut former des spores lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Li et al., 2016). Les spores sont des structures en dormance, métaboliquement inactives, qui se transforment en formes végétatives par un processus de germination lorsque les conditions deviennent favorables (Nicholson et al., 2002). Les spores de *C. perfringens* sont constituées d'un noyau entouré par une membrane interne et d'un cortex entouré par une membrane externe (Paredes-Sabja et al., 2009) (**Figure 6**).

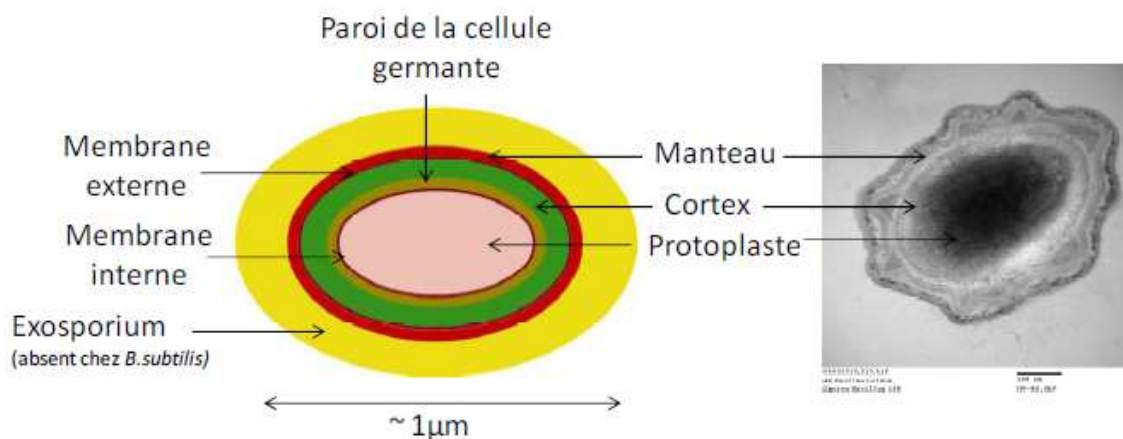


Figure 6. Schéma général de la structure de la spore bactérienne (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) et photographie en Microscopie Électronique à Transmission d'une spore de *Bacillus subtilis* (MET). Échelle : 100 nm.

La composition protéique de la membrane interne est très différente. En effet, bien que la membrane des cellules végétatives contienne de nombreuses protéines, la membrane interne de la spore possède, en plus des protéines membranaires classiques, d'autres protéines très spécifiques. Ces protéines vont être des transporteurs, mais surtout des récepteurs de germination (Paidhungat et Setlow, 2001). Cette composition confère donc à la membrane (de la spore) le rôle d'une importante barrière de perméabilité, ralentissant l'entrée des molécules dans la spore (Cortezzo et al., 2004). Celles-ci permettent à la spore de résister aux agents oxydants et aux produits chimiques. Les spores de *C. perfringens* sont résistantes aux radiations ionisantes, à la dessiccation, à la chaleur jusqu'à 80 °C pendant 20 minutes et à de nombreux solvants chimiques utilisés comme agents stérilisants (Harry et al.,

2009). La membrane externe ne semble pas jouer de rôle particulier dans la résistance des spores aux différentes conditions de stress (Riesenman et Nicholson, 2000).

2.1.1. Induction de la sporulation

L'entrée des cellules en sporulation dépend de plusieurs facteurs environnementaux tels que la limitation en nutriments et les conditions de stress (chaleur, variation de pH, dessiccation) (Nicholson et al., 2002 ; Stragier, 2002). En général, une limitation en sources de carbone, d'azote et de phosphore peut entraîner une entrée en sporulation. Lorsque la densité cellulaire augmente dans le milieu, des peptides spécifiques sont sécrétés et s'accumulent dans le milieu extracellulaire. Quand ces peptides atteignent une concentration critique, reflétant une forte concentration cellulaire, ils sont détectés par des récepteurs à la surface des cellules et peuvent entraîner une phosphorylation de la protéine Spo0A, qui est la protéine clé du déclenchement du processus de la sporulation. Ce processus mène à la formation de cellules en dormance qui sont métaboliquement inactives (Park et Rafii, 2018).

2.1.2. Processus de sporulation

Le processus de la sporulation chez *C. perfringens* n'est pas documenté comme c'est le cas chez *Bacillus subtilis*, qui sert de modèle chez les bactéries à Gram-positive sporulées (Schultz et al., 2009). Néanmoins, la formation des spores chez *C. perfringens* est similaire à celle de *Bacillus subtilis* (Li et al., 2016). Il s'agit d'un processus complexe, divisé en sept étapes, contrôlé par quatre facteurs sigma (σ) faisant intervenir séquentiellement 125 gènes (Al-Hinai et al., 2015). Ces facteurs sigma sont spécifiques de la sporulation et contrôlent l'expression de gènes de la préspore et de la cellule mère en début de sporulation (σ^F et σ^E) et plus tardivement dans la sporulation (σ^G et σ^K) (Piggot et Hilbert, 2004). Chacune de ces étapes reflète un état morphologique particulier.

Lorsque *C. perfringens* se trouve dans des conditions de carence nutritionnelle ou de stress, l'entrée en sporulation commence par une phosphorylation de la protéine Spo0A qui active à son tour la transcription des gènes nécessaires à la sporulation (Li et al., 2016). Les premières étapes (étapes 0-I) correspondent à la phase où les cellules végétatives se préparent à la sporulation. Elles correspondent généralement à la fin de la phase exponentielle de croissance. La sporulation débute par une division cellulaire asymétrique

près de l'un des pôles de la cellule. Cette étape est considérée comme l'étape II (**Figure 7**). Lors de cette étape, il y a formation d'un septum proche d'un pôle de la cellule, entraînant ainsi la formation de deux compartiments de tailles inégales : un plus grand, la cellule mère, et un plus petit, la préspore (Higgins et Dworkin, 2012). Chaque compartiment s'engage dans une voie de différenciation *via* différents facteurs σ : σ^E dans la cellule mère et σ^F dans la préspore (Piggot et Hilbert, 2004). σ^F entrainera l'activation de gènes impliqués dans la synthèse de récepteurs de germination et dans les constituants du cortex (Wang et al., 2006). Le septum commence à s'incurver et, finalement, la préspore s'intègre complètement dans la cellule mère. La préspore est englobée par la cellule mère, au cours d'un processus ressemblant à une phagocytose (McKenney et al., 2013). Il s'agit de l'invagination considérée comme l'étape III. L'étape IV correspond à la synthèse de deux couches de peptidoglycane correspondant au cortex et à la paroi de la future spore. Cette synthèse résulte de l'action de gènes exprimés dans la cellule mère, notamment sous le contrôle de σ^E , mais aussi de σ^k (Vasudevan et al., 2007). Cette étape est suivie de l'étape V qui voit la synthèse de l'enveloppe à l'extérieur de la spore en développement (McKenney et al., 2013). L'étape VI, appelée étape de maturation de la spore, se produit avec peu de changements morphologiques manifestes. Cependant, les propriétés caractéristiques de résistance aux conditions de stress, de dormance et de germination apparaissent à cette étape. Enfin, la cellule mère se lyse pour libérer la spore mature : il s'agit du dernier stade, l'étape VII (Leggett et al., 2012).

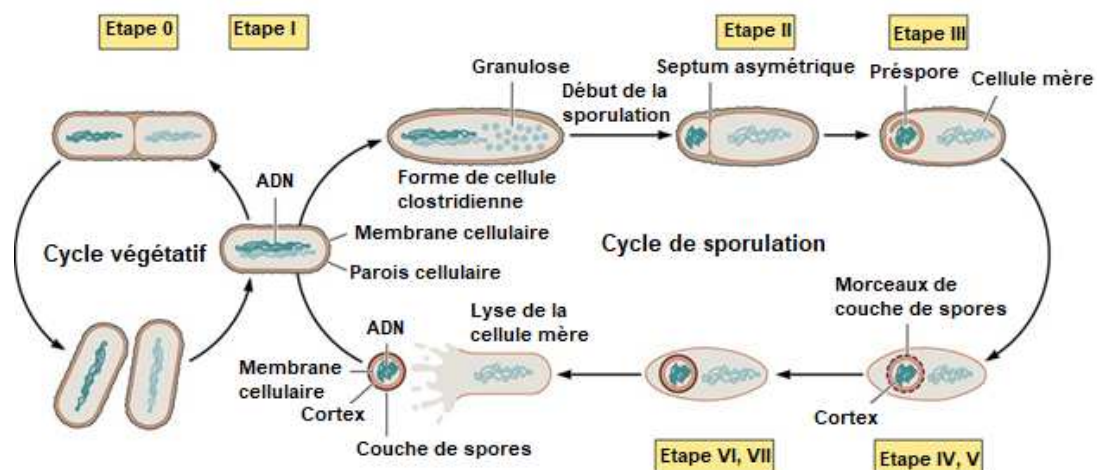


Figure 7. Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation de *C. perfringens* (d'après Al-Hinai et al., 2015)

Bien que la sporulation soit un mécanisme qui permet à la bactérie de survivre jusqu'à ce que les conditions environnementales changent et deviennent favorables à la croissance,

elle contribue directement à la pathogénèse. En effet, l'analyse génétique a montré que la transcription du gène *cpe* est contrôlée pendant la phase de sporulation des souches de *C. perfringens* par trois promoteurs (P1, P2 et P3) qui sont situés en amont du gène *cpe* (Li et al., 2016). Ces promoteurs dépendent de deux facteurs sigma (σ^E et σ^K) associés à la sporulation. Par ailleurs, la délétion des gènes codants pour ces facteurs ainsi que des gènes codants pour les facteurs σ^F et σ^G a montré que les quatre facteurs σ sont nécessaires à la sporulation mais que seuls les facteurs σ^E , σ^K et σ^F sont nécessaires pour la production de la CPE (Harry et al., 2009). La CPE ainsi libérée se lie alors aux récepteurs des entérocytes, s'oligomérisent et forme des pores dans la membrane plasmique, conduisant à une perméabilité accrue qui se manifeste par une diarrhée aqueuse et des douleurs abdominales (Shrestha et McClane, 2013).

2.1.3. Régulation de la production de facteurs virulence

Comme décrit dans les paragraphes précédents, *C. perfringens* produit de nombreux facteurs de virulence composés des toxines et enzymes hydrolytiques. L'expression de gènes codants pour ces facteurs de virulence est contrôlée par un système de régulation spécifique. La régulation est complexe et diffère selon les souches. En outre, l'action de plusieurs mécanismes est parfois nécessaire pour réguler la production d'un facteur de virulence (Ohtani, 2016). Par exemple, la CPE est produite lorsque *C. perfringens* sporule. En outre, les gènes *cpa*, *cpb*, *colA*, *pfoA*, *netB* et les gènes codants pour les sialidases (*nanH*, *nanI* et *nanJ*), sont contrôlés par des systèmes de régulation spécifiques. Ces systèmes de régulation comprennent les systèmes de régulation à deux composants, ou « *two component systems* » (TCSs), et les systèmes de communication cellule-cellule appelé le *Quorum Sensing* (QS) (Ohtani et Shimizu, 2016).

2.1.3.1. Régulation par les systèmes à deux composants (TCSs)

Les systèmes à deux composants (TCSs) sont des systèmes de régulation qui détectent la composition de l'environnement et transmettent l'information à la cellule (Ohtani et al., 2010). Ils sont constitués d'un senseur, ou protéine histidine kinase, et d'un régulateur (Ohtani, 2016). Le senseur détecte l'environnement ou le stimulus, transmet le signal au régulateur de réponse cytoplasmique qui agit comme un régulateur transcriptionnel (Aktories et Just, 2013). Le régulateur activé, à son tour régule l'expression de gènes codants pour les

facteurs de virulence (Dziejman et Mekalanos, 1995). À ce jour, 48 gènes impliqués dans la régulation par les TCSs sont connus. Vingt-huit de ces gènes sont des gènes de l'histidine kinase, et les vingt autres sont des régulateurs de réponse (Shimizu et al., 2002). Les TCSs chez *C. perfringens* ont été largement étudiés. Nous nous intéressons aux trois principaux qui sont liés à la régulation de facteurs de virulence.

2.1.3.2. Régulation par le système VirS/VirR

Le système VirS/VirR est l'un des systèmes de régulation à deux composants les plus connus et les mieux caractérisés. Il est codé par deux gènes *virS* et *virR* localisés sur le chromosome et formant un opéron (Ohtani et al., 2010). Le gène *virR* code pour un régulateur et le gène *virS* pour un récepteur histidine kinase. Le système VirS/VirR a été identifié comme étant le régulateur des gènes *cpa*, *pfoA* et *colA* (Ba-Thein et al., 1996). Les modes de régulation de ces gènes sont différents. En effet, le gène *pfoA* possède deux promoteurs dits majeur et mineur, mais seul le promoteur majeur dépend du système VirS/VirR. Le gène *colA*, quant à lui, possède deux promoteurs, mais un seul dépend du système virS/VirR. Le gène *cpa* n'a qu'un seul promoteur et dépend du système VirS/VirR (Ohtani, 2016). Des gènes plasmidiques peuvent également être régulés par le système VirS/VirR. Il a été démontré que lorsqu'une souche de *C. perfringens* de type C est mise au contact des cellules Caco-2, elle produit les toxines CPB et CPB2, alors qu'un mutant du gène *virR* ne les produit pas (Ma et al., 2011 ; Vidal et al., 2009). Certains facteurs de virulence sont régulés indirectement par le système VirS/VirR. Par exemple, le clivage de la protéase qui active la toxine ETX est dépendante du système VirS/VirR. Ceci indique que l'activité de la toxine ϵ est également régulée par le système VirS/VirR (Gibert et al., 2000). Le système VirS/VirR est donc l'un des plus importants régulateurs de facteurs de virulence identifiés chez *C. perfringens*.

2.1.3.3. Régulation par le système RevR

Le second TCS le mieux caractérisé est le système RevR. Celui-ci est impliqué dans la régulation de facteurs de virulence de *C. perfringens* : les sialidases et la toxine η ou hyaluronidase (Hiscox et al., 2013). Il a été démontré expérimentalement qu'une souche mutante au *RevR* présentait une virulence atténuée par rapport à la souche sauvage dans un modèle expérimental de myonécrose. Ces données montrent que le système de régulation

RevR joue un rôle important dans la régulation de facteurs de virulence de *C. perfringens* (Ohtani et al., 2010).

2.1.3.4. Régulation par communication cellule-cellule

Le *quorum sensing* (QS) est un système de communication inter-bactéries régulant l'expression des facteurs de virulence de *C. perfringens*. Ce système consiste en la sécrétion de signaux dont les concentrations sont dépendantes de la densité cellulaire et de la détection de ces signaux moléculaires (Ohtani et Shimizu, 2016). Plusieurs études rapportent que l'expression de gènes codants pour les facteurs de virulence de bactéries pathogènes est régulée par le *Quorum Sensing* (Rutherford et Bassler, 2012 ; Waters et Bassler, 2005 ; Bassler, 2002). Deux systèmes de communication cellule-cellule sont connus chez les bactéries à Gram-positif. Le premier utilise un peptide comme molécule signal pour stimuler l'expression de gènes. Ce système, appelé *agr* (*accessory gene regulator*), a été bien étudié chez *S. aureus*. Le second système, appelé *luxS*, est un système de communication commun aux bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. *C. perfringens* possède à la fois les systèmes *agr* et *luxS*. Le gène *luxS* est impliqué dans la régulation positive des gènes *cpa*, *colA* et *pfoA*. Le système *agr* est quant à lui impliqué dans la régulation de la production de la toxine ϵ chez les souches de toxinotype D (Ohtani, 2016). Comparés aux autres pathogènes, les mécanismes de régulation des facteurs de virulence chez *C. perfringens* ne sont pas encore très bien élucidés. Le mécanisme de régulation pour de nombreux facteurs de virulence, tels que TpeL, BEC et CadA, n'est pas rapporté. D'autres mécanismes de régulation de facteurs de virulence, comme l'implication de facteurs σ alternatifs, ont été décrits chez d'autres clostridies, notamment *C. botulinum* et *C. difficile* (Connan et Popoff, 2015). La connaissance de régulation par ces mécanismes reste cependant limitée en ce qui concerne *C. perfringens*.

2.2. Physiopathologie de *C. perfringens*

C. perfringens est largement répandu dans l'environnement et dans le microbiote intestinal (Uzal et al., 2014b). Il est responsable des infections à la fois histotoxiques et intestinales chez les humains et les animaux (McClane et al., 2013). Le syndrome post-traumatique, connu sous le nom de gangrène gazeuse, est l'une des infections histotoxiques nécrosantes des humains et des animaux (McClane et al., 2001). La gangrène gazeuse est associée à des plaies par lesquelles la bactérie (ou les spores) s'introduit dans l'organisme

(Stevens et al., 2012). En effet, *C. perfringens* est capable de s'échapper du phagosome et de persister dans le cytoplasme de macrophages. Lorsqu'il y a un environnement anaérobie adéquat pour sa croissance, *C. perfringens* commence alors à se multiplier, détruisant les muscles grâce à l'action des toxines α et θ (Goossens et al., 2017). Bien que l'incidence de la gangrène gazeuse chez les humains soit faible, le taux de létalité demeure généralement élevé (Stevens et al., 2012).

Les intoxications alimentaires à *C. perfringens* sont causées par l'entérotoxine (CPE) produite par les spores de *C. perfringens* dans les intestins (Grass et al., 2013 ; Xiao et al., 2012 ; Brynestad et Granum, 2002 ; Sarker et al., 2000). Elles surviennent lorsque les aliments, contaminés par les spores ou les formes végétatives de *C. perfringens*, sont refroidis lentement ou maintenus à une température entre 20 et 50 °C, permettant la germination et la croissance de *C. perfringens* (Lindström et al., 2011). Les cellules végétatives ingérées sporulent ensuite dans les intestins après un stress provoqué par l'acidité de l'estomac. La CPE est libérée dans la lumière intestinale lorsque la cellule mère se lyse pour libérer la spore. La **figure 8** décrit les différents événements menant à l'intoxication alimentaire à *C. perfringens*.

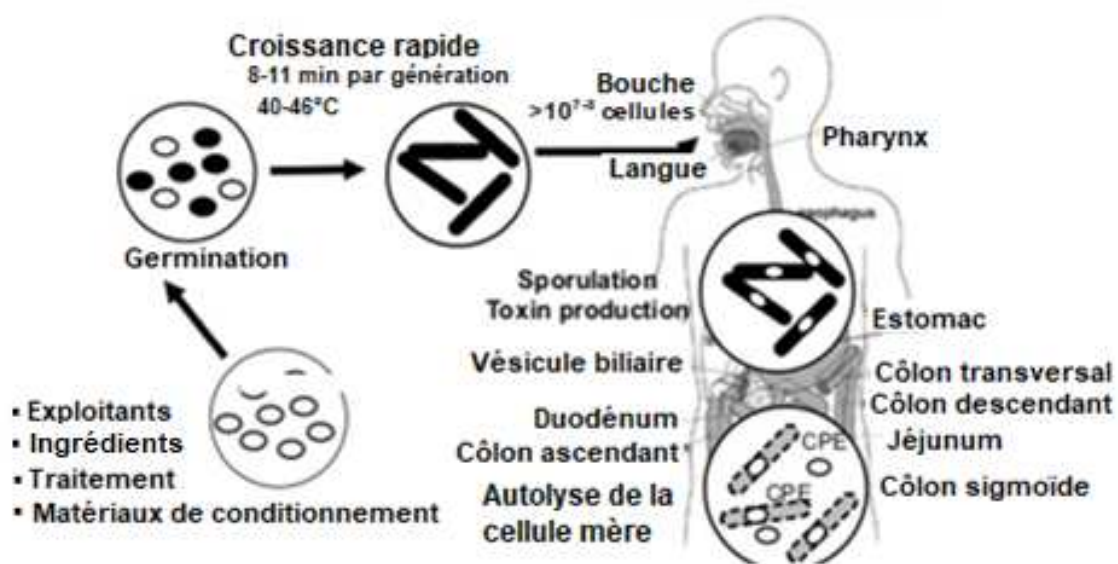


Figure 8. Étapes menant à une intoxication alimentaire à *C. perfringens* (Xiao et al., 2014)

Les symptômes principaux de l'intoxication alimentaire à *C. perfringens* comprennent la nausée, les douleurs abdominales et la diarrhée qui se manifestent 6 à 18 heures après ingestion et persistent ensuite pendant 12 à 24 heures (McClane et al., 2001). Les intoxications provoquées par *C. perfringens* sont rarement mortelles. Cependant, cette maladie peut être fatale chez les personnes âgées et les jeunes enfants.

C. perfringens est également à l'origine d'autres troubles intestinaux humains, notamment l'entérite nécrotique, appelée aussi maladie de Drambrand ou *Pigbel*, une forme rare et souvent mortelle (Zachariah, 2011). En effet, la maladie de Drambrand est associée à l'ingestion de repas riches en protéines par les personnes sous-alimentées ou déficientes en protéines. Le changement soudain de régime entraîne la croissance rapide de *C. perfringens* de type C présente dans le microbiote intestinal (Zachariah, 2011 ; Miclard et al., 2009). La toxine $\beta 1$ est la principale toxine responsable de la maladie de Drambrand. Cette toxine est normalement inactivée dans le tractus digestif par la trypsine, mais la faible teneur en protéine entraîne une réduction du taux d'enzymes pancréatiques comme la trypsine et, par conséquent, une réduction de l'inactivation de la toxine $\beta 1$ (Vidal et al., 2008).

Chez les animaux, *C. perfringens* est responsable de plusieurs maladies graves entraînant souvent des pertes économiques importantes (Uzal et al., 2014). Parmi ces maladies, nous pouvons citer l'entérite nécrotique (EN) aviaire et l'entérotoxémies bovine et ovine, ainsi que la dysenterie de l'agneau (Uzal, 2004 ; Keyburn et al., 2006). Les toxines α , $\beta 1$ et ϵ sont les principales toxines impliquées dans les entérotoxémies (Autheman et al., 2013). Ces dernières sont caractérisées par la réabsorption dans la circulation des toxines qui sont produites dans l'intestin, affectant ainsi d'autres organes comme le foie et le cerveau (Uzal et al., 2010 ; Popoff, 2014).

Ainsi, les infections intestinales et histotoxiques causées par *C. perfringens* résultent souvent des actions concertées des enzymes et des toxines induisant une augmentation de la perméabilité épithéliale et vasculaire (Goossens et al., 2017). Ces actions concertées et les réponses induites de l'hôte sur la muqueuse déclenchent une inflammation et/ou une nécrose intestinale. *C. perfringens* étant un germe ubiquitaire et présent dans le microbiote intestinal, il est généralement admis qu'un facteur déclenchant est nécessaire pour que *C. perfringens* produise les toxines et provoque la maladie (Uzal et al., 2014a). Le mécanisme exact du déclenchement de ces facteurs n'est toujours pas très bien élucidé. L'hypothèse la plus courante est la condition stressante ou le développement d'un environnement intestinal qui

favorise la croissance de *C. perfringens* et déclenche la production de toxines (Goossens et al., 2017 ; Mönnikes et al., 2001). En effet, *C. perfringens* produit différentes enzymes dont les sialidases, qui éliminent les résidus d'acide sialique des cellules. La dégradation de mucines entraîne la rupture de la couche protectrice du mucus, démasquant ainsi les sites potentiels de liaison de toxines et d'autres facteurs de virulence (Husebye, 2005). Elle entraîne également une perturbation de la barrière intestinale, provoquant ainsi une augmentation de sa perméabilité (Ficko-Blean et Boraston, 2006). L'augmentation de la perméabilité de la muqueuse facilite donc la pénétration de la toxine dans la muqueuse intestinale et permet d'atteindre les cellules cibles (Popoff, 2014). En outre, l'acide sialique libre et les fragments de mucines sont une source de carbone et d'azote favorisant la croissance de *C. perfringens* et la production de toxines. La **figure 9** résume les différents mécanismes de la physiopathologie de *C. perfringens*.

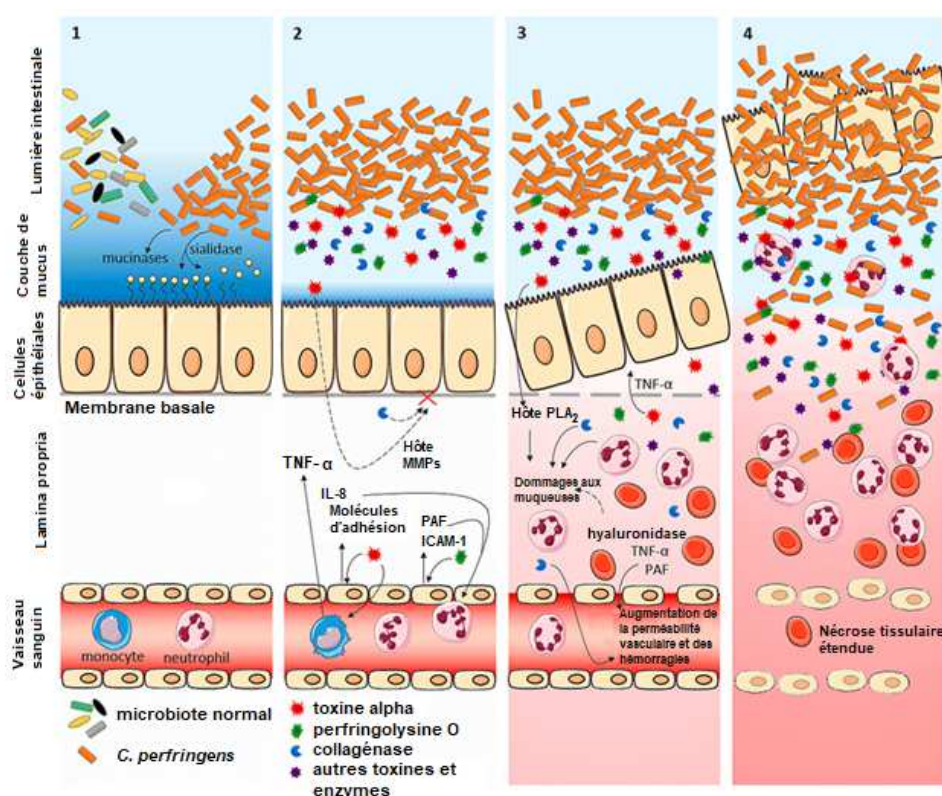


Figure 9. Modes d'actions concertés de facteurs de virulence de *C. perfringens* sur l'épithélium intestinal (d'après Goossens et al., 2017). *C. perfringens* produit de nombreux facteurs de virulence (toxines et enzyme hydrolytiques). Les effets de ces facteurs de virulence conduisent à une nécrose intestinale et permettent l'absorption des cytokines inflammatoires telles que TNF- α entraînant un choc et une mort rapide de la cellule.

2.3. Épidémiologie des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à *C. perfringens*

2.3.1. Déclaration des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)

2.3.1.1. Définition

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'incidence de deux cas ou plus, d'une maladie similaire, à symptomatologie gastro-intestinale le plus souvent, dont la cause peut être rapportée à une même origine alimentaire (Hennekinne et al., 2015). Une TIAC est dite confirmée lorsque la bactérie est isolée dans les selles de patients et dans le reste de l'aliment incriminé ou dans un aliment témoin. Les TIAC suspectées font référence au foyer dans lequel l'agent pathogène n'a pas été confirmé. Celui-ci est alors suspecté à l'aide d'un algorithme d'orientation étiologique prenant en compte les signes cliniques, la durée médiane d'incubation et le type d'aliments consommés (Vaillant et al., 2012).

2.3.1.2. Déclaration obligatoire de TIAC

La sécurité sanitaire des aliments représente une véritable préoccupation dans les secteurs agroalimentaires et de santé dans le monde (OMS, 2009). En France, les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont à déclaration obligatoire (DO) depuis 1987 et à signalement immédiat depuis le début des années 2000 (Vaillant et al., 2012). La déclaration peut être faite par des médecins et par des responsables d'établissements de restauration collective ou à caractère social. Elle est faite auprès de l'administration représentée par les Agences régionales de santé (ARS) et/ou la direction départementale de la Protection des populations (DDPP). La déclaration peut également être faite par des consommateurs ou d'autres personnes qui ont connaissance d'un épisode pouvant être une TIAC. Des investigations conjointes sont menées pour confirmer la TIAC et identifier l'origine de celle-ci afin de mettre en œuvre les mesures préventives et correctives nécessaires. Les déclarations et les conclusions sont remontées par les Agences régionales sanitaires aux DDPP, qui transmettent à leur tour les informations à la direction générale de l'Alimentation (DGAI). Cette dernière a pour mission de garantir la santé des consommateurs, des animaux, des végétaux et de l'environnement en s'assurant des conditions sanitaires dans lesquelles les produits sont mis sur le marché. Dans cette chaîne, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) peut être sollicitée par les DDPP ou

les ARS pour mener des analyses microbiologiques et/ou épidémiologiques dans le cadre des investigations de suspicion afin de confirmer la TIAC (Lindström et al., 2011 ; InVS, 2015).

2.3.2. Surveillance et incidence de TIAC en France

D'après le rapport de données épidémiologiques de l'Agence nationale de santé publique (Santé publique France), 1 445 TIAC, affectant plus de 13 000 malades, ont été déclarées en 2016 (Santé publique France, 2016). L'agent pathogène responsable le plus fréquemment confirmé était *Salmonella* avec 35 % des TIAC pour lesquelles un agent a été confirmé. Les agents les plus fréquemment suspectés sont *Staphylococcus aureus*, *C. perfringens* et *Bacillus cereus*, correspondant à 66 % des TIAC pour lesquelles un agent a été suspecté. Globalement, un agent pathogène a pu être confirmé microbiologiquement dans l'aliment incriminé ou chez au moins une personne malade dans 338 TIAC (23 % des cas). Dans 926 TIAC (64 % des cas), un agent pathogène a été suspecté, et dans 191 TIAC (13 % des cas), aucun agent n'a pu être identifié ou suspecté (**Tableau 5**).

Tableau 5. TIAC déclarées aux ARS et/ou aux DDPP – France, 2016

Agent	Foyers		Malades		Hospitalisations	
	N	%	N	%	N	%
Agents confirmés	338	23	5 069	36	241	38
Agents suspectés	926	64	6 887	49	322	51
Agents indéterminés	191	13	2 041	15	71	11
Total foyers	1 455	100 %	13 997	100 %	634	100 %

Au niveau européen, le système de communication sur les TIAC est fondé sur la directive 2003/99/CE relative à la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques (Anonymous, 2003). La déclaration de TIAC est obligatoire dans les États membres de l'Union européenne (UE) depuis 2005, mais n'a pas encore été harmonisée au sein de l'UE. L'absence d'harmonisation entrave la comparabilité de données entre les États membres. Cela est particulièrement évident pour les TIAC dues aux agents bactériennes *S. aureus*, *C. perfringens* et *B. cereus* (EFSA, 2015). En effet, au cours de ces dernières années (2010-2016), la France a déclaré 84,5 % de TIAC (3 630 sur 4 295) indiquant un système de « reporting » performant.

2.3.3. Incidence de TIAC à *C. perfringens*

Dans tous les pays développés, *C. perfringens* est considéré comme une des principales causes de TIAC installée au 2^e ou au 4^e rang selon les critères épidémiologiques retenus (Grass et al., 2013). Les données épidémiologiques de Santé publique France indiquent qu'au cours des dix dernières années, *C. perfringens* occupe le 3^e rang en nombre de TIAC d'origines bactériennes confirmées, après *Salmonella* et *B. cereus* (**Figure 10**). *C. perfringens* est également classé comme 4^e cause de TIAC suspectées après *S. aureus*, *B. cereus* et *Salmonella* (**Figure 11**). Entre 2007 et 2016, *C. perfringens* totalisait 194 TIAC confirmées, touchant 5 469 malades. *C. perfringens* a été également suspectée dans 622 TIAC, impliquant 9 157 malades (<http://invs.santepubliquefrance.fr/>) (Santé publique France, 2007-2017).

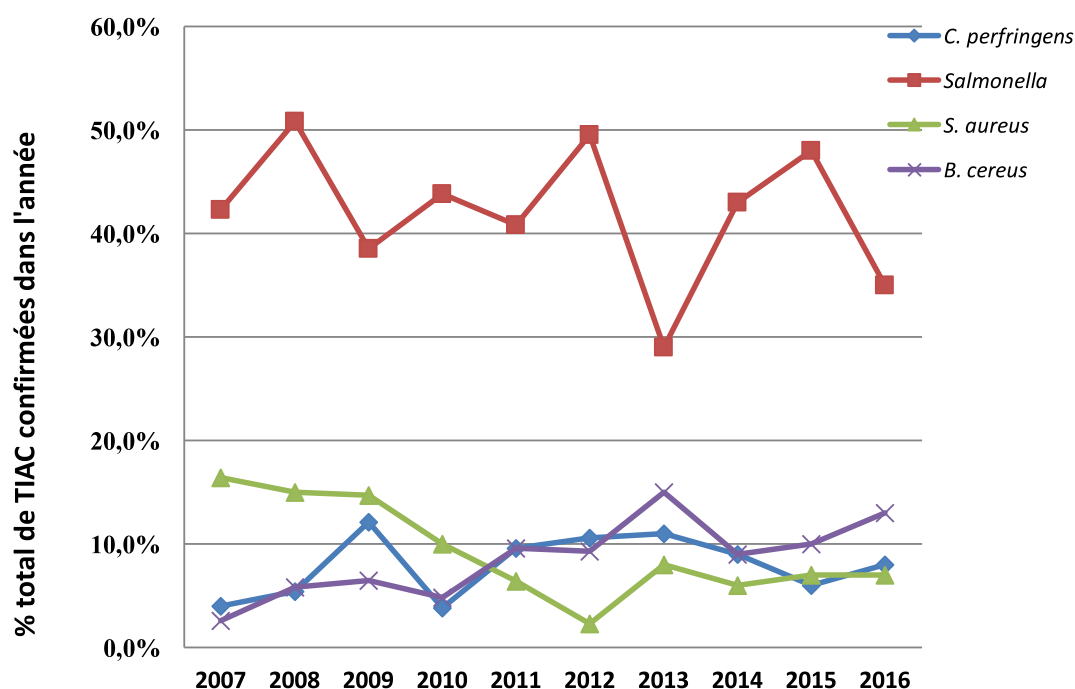


Figure 10. Évolution du nombre de foyers de TIAC confirmées par agent pathogène entre 2007 et 2016

À l'échelle européenne, l'EFSA rapporte 96 TIAC à *C. perfringens* survenues en 2016 dans sept États membres, impliquant 2 014 malades et trois décès (EFSA, 2016). Il faut signaler que de nombreux foyers sont certainement non détectés ou non diagnostiqués, car *C. perfringens* n'est pas systématiquement recherché en cas de TIAC dans de nombreux pays européens. De

plus, la DO est la seule source en France qui recense les cas, uniquement épidémiques, d'intoxications alimentaires à *C. perfringens* (Anses, 2010).

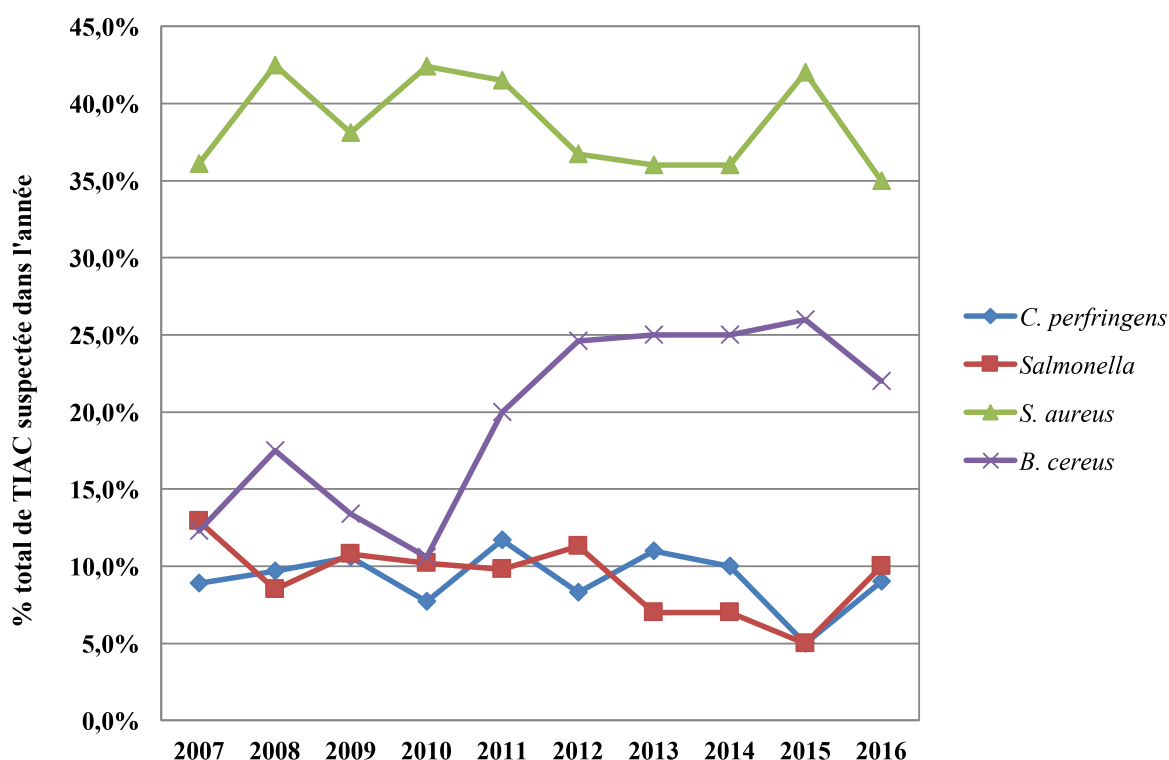


Figure 11. Évolution du nombre de foyers de TIAC suspectées par agent pathogène entre 2007 et 2016

2.3.4. Sources de contamination

Comme évoqué précédemment, *C. perfringens* est à la fois un germe ubiquitaire et un contaminant fréquent de produits alimentaires. De ce fait, elle peut être responsable d'intoxications alimentaires en provoquant des infections gastro-intestinales chez l'Homme (Brynstad et Granum, 2002). L'intoxication alimentaire résulte de l'ingestion d'aliments contaminés par *C. perfringens* entérotoxigène (Grass et al., 2013). Toutes les catégories de produits alimentaires, notamment les plats cuisinés à base de viande, sont considérés comme étant à risques (EFSA, 2010). Les préparations à forte teneur en amidon, comme les haricots en sauce, sont également à risque (EFSA, 2015). En France jusqu'à 2012, l'Institut de veille sanitaire (InVS) rapportait les matrices alimentaires impliquées conjointement dans les TIAC à *C. perfringens* et *B. cereus*. Ceci ne permettait pas de connaître les matrices alimentaires les plus impliquées dans les TIAC à *C. perfringens* (InVS, 2012). Entre 2013 et 2016, les TIAC à

C. perfringens ont été majoritairement (38 % des cas) associées à la consommation de plats avec des aliments composés, de plats cuisinés ou de viandes (25 %). Les volailles et les charcuteries ont été respectivement associées à 15 % et 4 % des cas (InVS, 2013, 2014, 2015, Santé publique France, 2016).

2.3.5. Lieux de survenue de TIAC à *C. perfringens*

Les TIAC à *C. perfringens* surviennent souvent dans les institutions où les aliments sont préparés en grande quantité et sont ensuite conservés au chaud pendant longtemps avant d'être servis. En France, 72 % des TIAC à *C. perfringens* sont survenues en restauration collective regroupant les cantines scolaires, les cantines d'entreprises et les instituts médico-sociaux.

2.3.6. Mode de contamination des aliments

Sachant que les TIAC à *C. perfringens* sont associées principalement à la consommation des aliments d'origine animale, les tractus intestinaux des animaux destinés à l'alimentation peuvent être considérés comme principal réservoir des souches productrices de CPE (Lindström et al., 2011). De ce fait, la présence de *C. perfringens* dans les viandes peut résulter d'une contamination primaire. Ainsi, les carcasses de mammifères ou de volailles peuvent être contaminées soit lors de la phase d'éviscération à l'abattoir, soit à partir de l'environnement souillé (plan de travail, poussières, outils de découpe) (Anses, 2010). La contamination des aliments peut résulter également d'une contamination d'origine humaine lors de la fabrication ou de la préparation de l'aliment. Dans ce cas, la contamination peut se faire directement lors de la manipulation des aliments (Lindström et al., 2011).

CHAPITRE 3. MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DE *C. PERFRINGENS*

3.1. Test de neutralisation sur souris

Le test de neutralisation sur souris est la technique la plus ancienne mais aujourd'hui peu utilisée, sauf dans le cadre de la recherche. Le principe consiste à injecter à une souris des toxines et les anticorps présumés correspondants. La mort de l'animal signifie qu'on lui a injecté une toxine sans son anticorps neutralisant (Stark et Duncan, 1971). On peut alors déduire le type de toxine responsable du décès. Cependant, cette méthode nécessite une grande quantité de toxines actives et un antisérum neutralisant spécifique pour chaque toxine. De plus, elle est coûteuse et suscite une préoccupation éthique en raison de l'utilisation d'animaux expérimentaux. Par conséquent, au cours des vingt dernières années, ces méthodes ont été largement remplacées par différentes techniques de biologie moléculaires, afin de caractériser les souches de *C. perfringens* et distinguer les isolats pathogènes des isolats non pathogènes.

3.2. Méthode normalisée de détection de *C. perfringens*

Compte tenu de la réglementation et du caractère obligatoire de la déclaration des intoxications alimentaires collectives, *C. perfringens* est habituellement dénombré dans les aliments selon des méthodes normalisées. La norme NF ISO 7937 est la méthode officielle utilisée pour le dénombrement de *C. perfringens* dans les aliments. Selon cette méthode, le dénombrement se fait en milieu gélosé tryptose-sulfite (TSC) à la D-cyclosérine en anaérobiose à 37 °C. Le milieu TSC contient du sodium et de citrate ferrique qui sont réduits par *C. perfringens* en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies. La D-cyclosérine inhibe la flore contaminante. La confirmation des colonies est réalisée en bouillon lactose sulfite à 46 °C où cinq colonies isolées sur gélosées TSC sont testées pour leur production de gaz et de sulfite de fer caractéristiques à *C. perfringens*. Cette méthode permet de certifier la présence de *C. perfringens* dans les aliments. Cependant, compte tenu du caractère ubiquitaire de *C. perfringens*, sa présence dans les aliments ne permet pas de conclure qu'il est l'agent responsable de l'intoxication alimentaire. Des techniques visant à établir des liens entre la présence de *C. perfringens* et son

pouvoir pathogène sont aujourd'hui nécessaires pour confirmer l'implication de *C. perfringens* dans l'intoxication alimentaire ou de retracer l'origine d'une contamination.

3.3. Méthodes moléculaires

3.3.1. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Parmi les méthodes moléculaires utilisées pour caractériser *C. perfringens*, la PCR est la plus utilisée pour la recherche de gènes codants pour les toxines. Divers protocoles de PCR, y compris les tests de PCR multiplex, ont été utilisés pour étudier le pouvoir toxigène de *C. perfringens*. Les gènes ciblés ont été préférentiellement les gènes codants pour les toxines α , β , ϵ , ι et CPE (Baums et al., 2004). En outre, des techniques PCR ciblant d'autres gènes, comme les gènes codants pour les toxines NetB et TpeL, ont également été récemment développées (Bailey, 2013). Depuis 2008, l'utilisation de méthodes PCR quantitatives en temps réel qui permettent la détection simultanée des produits amplifiés, en associant à chaque cycle d'amplification la mesure de la quantité d'ADN grâce à un marqueur fluorescent, est de plus en plus fréquente. Cette technique reste sensible et spécifique par l'amplification du gène cible. Cependant, les protocoles existants à ce jour ne portent que sur la détection (et la quantification par qPCR) des gènes *cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *ia* et *cpe* (Albini et al., 2008).

3.3.2. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

La MLEE a été utilisée pour étudier la diversité génétique des souches de *C. perfringens* isolées des sources animales (bovine, porcine, ovine) et humaines (sang, fèces, suppurations) (Pons et al., 1997). Cette méthode est basée sur la comparaison de profils électrophorétiques des enzymes métaboliques de la bactérie (Ashton, 1990). Les variations de migration, liées aux différences de charges, sont le reflet des variations alléliques (polymorphisme enzymatique). Appliquée à *C. perfringens*, une grande diversité génétique a été observée et aucune corrélation évidente n'a été établie entre les types des profils et l'origine des souches.

3.3.3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

La méthode AFLP est une méthode de typage moléculaire combinant profil de restriction et PCR. Elle a été utilisée pour le typage de *C. perfringens* afin de confirmer au sein d'une même TIAC que les souches isolées des patients et celles isolées des aliments étaient les mêmes (McLauchlin et al., 2000). Elle est adaptée pour la comparaison des isolats au sein d'une même TIAC. Elle est

cependant moins adaptée pour le typage des souches provenant d'épidémies différentes ou des souches isolées de diverses sources en raison de la diversité génétique de *C. perfringens* et de la complexité des profils générés par cette méthode (McLauchlin et al., 2000).

3.3.4. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE est une technique de typage moléculaire très discriminante, décrite comme la « *Gold standard* » pour le génotypage de bactéries pathogènes. Elle a notamment été utilisée en épidémiologie moléculaire pour le typage de bactéries comme *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* (Fugett et al., 2007 ; Laconcha et al., 2000). Cette méthode est basée sur la séparation de fragments de grande taille (jusqu'à 800 kb) provenant de la digestion enzymatique du génome bactérien par une enzyme de restriction coupant peu fréquemment (Maslanka et al., 1999). La PFGE a été utilisée pour étudier la diversité génétique des souches de *C. perfringens* isolées de diverses origines (Yadav et al., 2018). Bien que cette technique ait montré un pouvoir discriminant élevé entre les souches isolées d'une même épidémie ou d'un même épisode toxique, elle n'a pas été capable de mettre en évidence une corrélation entre les souches de *C. perfringens* et leurs origines. De plus, la PFGE ne peut pas s'appliquer sur certaines souches de *C. perfringens* en raison de la dégradation de l'ADN par des nucléases endogènes (Schalch et al., 2003).

3.3.5. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)

Un VNTR est une séquence de nucléotides répétés plusieurs fois en tandem. La variation du nombre de copies de cette séquence crée un polymorphisme de taille. Le typage de *C. perfringens* par l'analyse de répétitions en tandem polymorphes (VNTR) a été développée par Sawires et Songer (2005). D'autres auteurs (Chalmers et al., 2008) l'ont utilisée sur une collection de souches issues d'espèces animales (porcine, bovine, volaille, etc.) isolées dans différentes épidémies. La méthode a montré un pouvoir discriminant élevé pour les souches issues de mêmes épidémies (Vergnaud et Pourcel, 2009).

3.3.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

La MLST est une méthode de typage moléculaire des souches bactériennes basée sur le séquençage de six à huit gènes de ménage ou « *housekeeping genes* » (Chalmers et al., 2008). Ces

gènes codent pour des protéines essentielles et présentent des polymorphismes stables dans le temps (Achtman et al., 2012). Les séquences des gènes étudiés sont donc conservées entre les souches, elles présentent néanmoins un nombre limité mais suffisant de polymorphisme nucléotidique SNP pour distinguer les souches entre elles. En fonction de la séquence de chaque gène et des variations nucléotidiques, les souches se voient attribuer un profil allélique ou « séquence type » (ST). Ces ST permettent de différencier les souches entre elles et de faire des études phylogénétiques. Les schémas MLST ont été utilisés avec succès pour identifier et caractériser des souches de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* isolées des épisodes toxiques (Achtman et al., 2012 ; Salcedo et al., 2003).

Des auteurs ont proposé deux schémas MLST différents pour le typage de *C. perfringens*. Le premier schéma a été développé par Jost et al. (2008) dans le but de différencier des souches de *C. perfringens* en fonction de leur origine (hôte) ou de la maladie. Une grande diversité génétique a été obtenue avec 80 ST différents. Les auteurs n'ont pas pu établir un lien entre les profils observés et l'origine des souches, notamment pour le toxinotype A (Jost et al., 2006). Le deuxième schéma, développé par Xiao et al. (2012), avait pour objectif de distinguer des souches entérotoxigènes et non entérotoxigènes. Deux grands groupes associés aux souches entérotoxigènes (*cpe*-chromosomique) et un troisième groupe composé de souches non entérotoxigènes et de souches portant le gène *cpe* plasmidique ont été obtenus. C'est le seul schéma actuellement disponible en ligne pour le typage de *C. perfringens* par MLST. Ce schéma est aujourd'hui moins discriminant du fait que les données proviennent d'une seule étude et ne sont pas mises régulièrement à jour.

3.4. Apport de la génomique à la caractérisation de *C. perfringens*

3.4.1. Séquençage de génomes

Le séquençage des génomes complets ou « *Whole Genome Sequencing* » (WGS) qui a connu un essor très important depuis 2001, est à l'origine d'une nouvelle discipline : la génomique (Consortium, 2004). Le séquençage de génomes bactériens (en particulier des pathogènes humains) a énormément bénéficié des progrès technologiques. Le WGS a notamment amélioré la sécurité sanitaire des aliments, par une détection précoce des épidémies d'origine alimentaire (Stasiewicz et al., 2015). Aux États-Unis par exemple, la surveillance épidémiologique de pathogènes d'origine alimentaire utilisant le séquençage de génome complet a réalisé des avancées considérables avec le projet

« *GenomeTrakr* » (Stevens et al., 2017). Par exemple, l'application systématique de l'approche WGS a permis une amélioration du diagnostic de la listériose. En outre, elle a permis de retracer les épidémies de listériose jusqu'à la source alimentaire. Le WGS est aujourd'hui largement utilisé par les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) et l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour caractériser les isolats d'origines alimentaire et clinique de *Salmonella* et de *Listeria monocytogenes*. Cette approche reste donc la plus discriminante, comparée aux méthodes de typage telles que la MLST ou la PFGE, pour identifier une variabilité génomique au sein d'espèces bactériennes, voire jusqu'au niveau de l'isolat. Son application à d'autres bactéries comme *C. perfringens* contribuerait à l'amélioration de la caractérisation de souches responsables d'épidémies d'origine alimentaire.

3.4.2. Caractéristiques générales du génome de *C. perfringens*

L'évolution des bactéries est un processus complexe qui se fait par plusieurs mécanismes tels que les mutations, les réarrangements génétiques, ou par les événements de transferts horizontaux de gènes (Stevens et al., 2017). Le transfert horizontal de gènes joue un rôle important dans l'évolution des bactéries. Il permet d'acquérir de nouvelles fonctions ou de nouveaux caractères phénotypiques, et de lier la coexistence des espèces au sein d'une même niche écologique (Koonin et al., 2001). Il permet également la reconstruction phylogénétique des microorganismes. La génomique présente une grande importance dans la reconstruction des phylogénies, l'identification de marqueurs spécifiques à un groupe ou espèce donnés, et l'attribution de sources des infections ou de contamination.

Le premier génome complet de *C. perfringens* séquencé et publié est celui de la souche 13 (str 13) de toxinotype A et capable de causer la gangrène gazeuse dans un modèle expérimental (Shimizu et al., 2002). Avant cela, la carte génétique de la souche CPN50 a permis de déterminer que *C. perfringens* possède un chromosome circulaire et d'identifier des facteurs de virulence situés sur le chromosome (Shimizu et al., 2001). Le séquençage de la souche 13 a révélé que son génome est constitué d'un chromosome circulaire de 3 031 430 bases, avec un contenu en GC de 28 %. Le génome de la souche 13 comporte également 2 660 régions codantes (CDS) couvrant 83 % de la séquence chromosomique entière, dont 502 (18,9 %) gènes putatifs de fonctions inconnues, 666 (25 %) gènes putatifs uniques sans homologues dans la base de données, 55 gènes d'ARNt et 10 opérons d'ARN

ribosomique (Lepp, 2012). La souche 13 possède également un plasmide appelé pCP13 de 54,3 kb contenant 63 cadres ouverts de lecture, ou *Open Reading Frames* (ORFs). La majorité des ORFs sur le pCP13 code pour des protéines putatives de fonctions inconnues. Seize ORFs possèdent une similitude avec des protéines putatives d'autres microorganismes. La comparaison du génome de la souche 13 avec d'autres génomes du même genre, notamment *Clostridium acetobutylicum*, a révélé que plusieurs gènes sont spécifiques à *C. perfringens* str13, comme les gènes codants pour les protéines associées aux facteurs de virulence parmi lesquelles les gènes *cpa*, *colA*, et *pfoA* (Ohtani et al., 2003 ; Nölling et al., 2001). En revanche, tous les gènes associés à la virulence ne forment pas des îlots de pathogénicité. Les gènes codants pour les facteurs σ , spécifiques à la sporulation sont également présents dans le génome de la souche 13 (Shimizu et al., 2002).

3.4.3. Génomique comparative de *C. perfringens*

Les études comparatives *in silico* sur les génomes des microorganismes permettent de progresser dans de nombreux domaines, notamment concernant la structure et la diversité des génomes et en particulier l'identification de gènes de virulence (Tettelin et al., 2008). Ces gènes peuvent être multiples et variés. Ce sont principalement les gènes codants pour des toxines et les gènes codants pour des fonctions liées aux interactions avec l'hôte qui sont recherchés comme déterminants de la virulence (Lepp, 2012).

Le séquençage de la souche ATCC13124 isolée d'un cas de gangrène gazeuse humaine et la souche SM101, d'origine alimentaire productrice de la CPE, a permis d'effectuer une première analyse comparative de séquençage génomique de *C. perfringens* (Myers et al., 2006). Ensuite sept génomes morcelés ou « *draft genomes* », dont trois provenant de toxinotype A, et un génome des toxinotypes B à E ont été déposés dans la base de données Genbank, bien qu'une description détaillée de ces génomes n'ait été publiée que récemment (Hassan et al., 2015). Ces données additionnelles ont permis d'explorer d'autres questions, notamment la relation phylogénétique entre les différents toxinotypes associés à différents états pathologiques. Elles ont permis une première approche comparative de génomes afin de comprendre comment ces différents toxinotypes de *C. perfringens* ont évolué et se sont adaptés à des niches écologiques aussi diverses. Les analyses de génomique comparative ont indiqué une variation importante au sein du pangénome (Hassan et al., 2015). Le pangénome inclut le « core-génome », ou génome central, contenant les gènes présents chez toutes

les espèces de *C. perfringens*, et le génome accessoire contenant les gènes présents dans au moins deux souches et les gènes uniques, spécifiques d'une seule souche (Tettelin et al., 2008).

La comparaison de gènes du core-génome de différents toxinotypes a montré qu'il n'existe pas de gènes spécifiques permettant de distinguer le toxinotype A des autres toxinotypes (B à E). Ces résultats indiquent que le toxinotype A ne forme pas un groupe clonal distinct et que les caractéristiques génétiques principales définissant un toxinotype sont probablement le gain ou la perte du plasmide contenant le gène utilisé dans la classification.

Une récente étude portant sur la diversité génomique de 56 génomes de *C. perfringens* a montré pour la première fois une grande plasticité du génome de *C. perfringens*. En effet, les résultats de cette étude ont révélé que seulement 1 470 gènes, soit 12,6 %, du pangénome appartiennent au core-génome, sur 11 667 que compte le pangénome. Cette analyse implique une grande plasticité du génome de *C. perfringens* plus que de tout autre procaryote actuellement publié (McInerney et al., 2017). Cette diversité peut être expliquée en partie par l'acquisition par transfert horizontal des éléments génétiques mobiles (Li et al., 2013). La comparaison du core-génome et du génome accessoire des souches impliquées dans les entérites nécrotiques chez la volaille a révélé que la pathogénicité des souches n'est pas corrélée aux gènes présents dans le core-génome (Lacey et al., 2018).

3.5. Éléments génétiques mobiles (EGM)

3.5.1. Définition et terminologie

Les génomes bactériens contiennent une quantité importante de séquences d'ADN étranger codant pour des enzymes ou d'autres protéines qui provient d'un autre organisme et qui a été inséré dans le génome. Ces fragments d'ADN, appelés éléments génétiques mobiles, sont capables de se déplacer au sein des génomes (mobilité intracellulaire) ou entre les bactéries (mobilité intercellulaire) (Frost et al., 2005). Ils regroupent les séquences d'insertion, les transposons, les plasmides et les phages. Ils participent à l'évolution du génome de leur hôte et sont considérés comme responsables en grande partie de la diversité génétique puisqu'ils peuvent causer des changements génétiques très variables (Kazazian, 2004). Les éléments génétiques mobiles peuvent influencer sur la virulence de la bactérie, soit par leur action sur les gènes de virulence existants, soit par leur participation à l'acquisition et à la dissémination de nouveaux gènes (Vandecraen et al., 2017). Quatre types

d'éléments génétiques mobiles ont été décrits chez *C. perfringens* : les plasmides, les phages, les éléments transposables et les îlots génomiques (Shimizu et al., 2001).

3.5.2. Les séquences d'insertion

Les séquences d'insertion ou IS sont les éléments transposables les plus simples et les plus abondants chez les procaryotes (Haniford and Ellis, 2015). Elles ont une organisation génétique compacte avec une taille inférieure à 2,5 kb, et codent pour une enzyme appelée transposase, dont la fonction est de conférer de la mobilité à ces IS (Koonin et al., 2001). Elles sont capables de s'insérer à différents sites dans le génome sans nécessiter une large région d'homologie avec la séquence nucléotidique cible (Roberts et al., 2008). L'implication des IS dans l'évolution et la plasticité des génomes de bactéries a été démontrée. En effet, les IS peuvent incorporer des gènes de virulence additionnels (Haniford and Ellis, 2015). Peu d'études sont disponibles dans la littérature en ce qui concerne *C. perfringens* (Li et al., 2010, 2013b ; Miyamoto et al., 2002). Ces études existantes concernent notamment les IS retrouvées à proximité des gènes codant les toxines *cpe* et *etx* (Li et al., 2013). Ce sont les IS1469, IS1470, IS1469-like et IS1151 (Li et al., 2010, 2013b ; Miyamoto et al., 2002).

3.5.3. Les plasmides

Les plasmides sont des éléments extra-chromosomiques instables capables d'être transférés d'une bactérie à une autre, permettant ainsi un échange d'informations génétiques. Les échanges permettent également une acquisition de résistance ou de virulence, ou une apparition de nouveaux caractères phénotypiques (Llosa et al., 2002). Les plasmides de *C. perfringens* ont été au centre des études pendant de nombreuses années en raison de leur prévalence, de leur diversité et de leur portage de gènes clés de virulence (Adams et al., 2015). En plus des gènes associés à des facteurs de virulence que l'on trouve sur le chromosome, les plasmides de *C. perfringens* sont porteurs des gènes codant des toxines, de gènes de résistance aux antibiotiques, de résistance aux bactériocines, de gènes du métabolisme et d'éléments régulateurs (Li et al., 2013c). Identifiés il y a près de 40 ans, il est maintenant clairement établi qu'un vaste pool de plasmides serait maintenu au sein de la population de *C. perfringens*. Ils pourraient être échangés d'une bactérie à une autre par conjugaison (Bannam et al., 2006). La taille des plasmides de *C. perfringens* varie de 45 kb à 140 kb et le nombre de copies de chacun de ces plasmides est généralement très faible chez un même isolat. Il a été

rapporté que jusqu'à trois plasmides différents peuvent être portés par une souche de *C. perfringens* (Li et al., 2013c). Des séquences de plasmides portant les gènes *cpb2*, *etx*, *netB*, *ia/ib* et *cpe*, ainsi que des plasmides codants pour la résistance à la tétracycline, sont aujourd'hui de plus en plus étudiés. Les résultats de ces études montrent que ces plasmides sont étroitement reliés, ce qui suggère une origine commune (Mehdizadeh Gohari et al., 2016). En effet, les degrés d'homologie des différentes séquences associées à chacun de ces plasmides supposent que tous les plasmides de *C. perfringens* actuellement connus seraient le résultat de l'évolution de deux plasmides ancestraux, soit pCPF5603 et pCP4969. Il a été suggéré que ceci pourrait avoir un impact sur la capacité d'une souche de *C. perfringens* à porter une combinaison spécifique, ainsi que sur la possibilité pour un même plasmide de porter des combinaisons précises de gènes codants pour des facteurs de virulence (Lacey et al., 2017). De plus, une région 35 kb hautement conservée, renfermant un locus de conjugaison (*Tn916*) nommé *tcp* ou « *transfer clostridial plasmid* », et formée de onze gènes, est retrouvée dans les plasmides de *C. perfringens*. Ces caractéristiques assureraient un transfert efficace de ces plasmides, conférant ainsi une adaptabilité remarquable aux souches de *C. perfringens* (Li et al., 2013).

3.5.4. Les phages

Les bactériophages, communément appelés phages, sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Ils représentent l'entité vivante la plus importante sur terre : on en compte entre 10^{30} et 10^{32} (Haq et al., 2012). Il existe deux types de phages : les phages lytiques et les phages tempérés (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Les phages infectant la cellule bactérienne peuvent suivre un cycle lytique. Lors de ce cycle, la cellule infectée est lysée suite à la réplication immédiate du phage, après que celui-ci a détourné la machinerie de réplication cellulaire (Kim et al., 2012). En revanche, certains phages dits tempérés suivent un cycle lysogénique au sein de la bactérie hôte sous la forme de prophages. Ils s'intègrent au chromosome bactérien, assurant ainsi son maintien au cours des générations (Seal et al., 2011). Les chromosomes bactériens contiennent une proportion importante de séquences de phages (Canchaya et al., 2004). Par exemple, 10 % du génome de *Streptococcus pyogenes* et 16 % du génome d'*Escherichia coli* O157 : H7 représentent des séquences de phages. Le premier phage infectant *C. perfringens* identifié et séquencé est le phage Φ 362613, suivi ensuite du phage Φ SM101 identifié dans le génome de la

souche alimentaire SM101 (Myers et al., 2006). Jusqu'à 2015, quatorze phages de *C. perfringens* étaient connus et séquencés (Kim et al., 2012). La plupart des études publiées sur le sujet se sont intéressées à l'activité lytique de ces bactériophages, ou de leurs enzymes lytiques en conditions expérimentales (Nariya et al., 2011). Une étude rapporte une grande diversité de prophages chez *C. perfringens* comparée aux autres clostridies, notamment *Clostridium difficile*. Cette grande diversité de prophages explique en partie la plasticité du génome de *C. perfringens* et son adaptation à différents hôtes humains et animaux (Kiu et al., 2017).

Récemment, des séquences de phages Φ CP390 et Φ CP26F, ainsi que Φ CP90, Φ CP130 et Φ CP30 ont été identifiées dans les génomes de *C. perfringens* (Kiu et al., 2017). Le podovirus Φ CPV1 a été décrit comme le plus petit phage infectant *C. perfringens* isolé à ce jour, tant en matière de dimensions de particules que de taille de son génome.

3.5.5. Le système CRISPR-Cas

Les bactéries sont constamment sujettes aux attaques virales (Westra et al., 2014). Elles sont soumises à une pression sélective très importante. Leur évolution s'est donc logiquement accompagnée d'un ensemble de défenses innées pour repousser ces prédateurs (Makarova et al., 2011). Le système CRISPR (« *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* ») désigne la structure du génome dont l'expression confère une immunité adaptative aux bactéries et archées (Terns and Terns, 2011). Il s'agit de courtes séquences d'ADN palindromiques répétées, espacées par des portions d'ADN non répétées de 20 à 40 nucléotides appelées *spacers* (Kunin et al., 2007). Ces *spacers* correspondent à des séquences d'éléments génétiques mobiles (EGM) (le plus souvent virales) que les bactéries auraient rencontrées au cours de leur évolution. Le locus CRISPR contient également différents gènes associés, conservés entre les procaryotes appelés *Cas* (*CRISPR-associated*) (Jansen et al., 2002). Plus de 45 gènes *Cas* ont été décrits. Cependant, un microorganisme ne possède qu'entre quatre et onze gènes *Cas* différents (Makarova et al., 2011). En amont du locus CRISPR se trouve une région leader, riche en adénine et thymine (A-T), contenant entre 20 et 534 paires de base. Le locus CRISPR est transcrit à partir d'un promoteur localisé dans cette région leader (Tyson et Banfield, 2008 ; Jansen et al., 2002). Actuellement, six types de système CRISPR-Cas (I-VI) sont identifiés et divisés en deux grandes classes, classe 1 et classe 2, en fonction de l'organisation du locus et de la machinerie protéique nécessaire pour le clivage de l'ADN exogène (Makarova et al.,

2015). Le locus CRISPR de type II est le plus connu et le mieux caractérisé. En plus des gènes *cas1* et *cas2*, communs à tous les types, le locus CRISPR de type II contient le gène *cas9* codant pour l'endonuclease du même nom, qui est impliquée dans l'acquisition des *spacers*, la biogenèse des crARN et le clivage de l'ADN cible (Kunin et al., 2007). Les crARN sont de courtes portions d'ARN contenant chacun un *spacer* unique, qui va guider l'activité de la nucléase *Cas* et ainsi reconnaître et cliver l'ADN. La **figure 12** présente le schéma simplifié des systèmes CRISPR-Cas de type II d'après Guernet et Grumolato (2017).

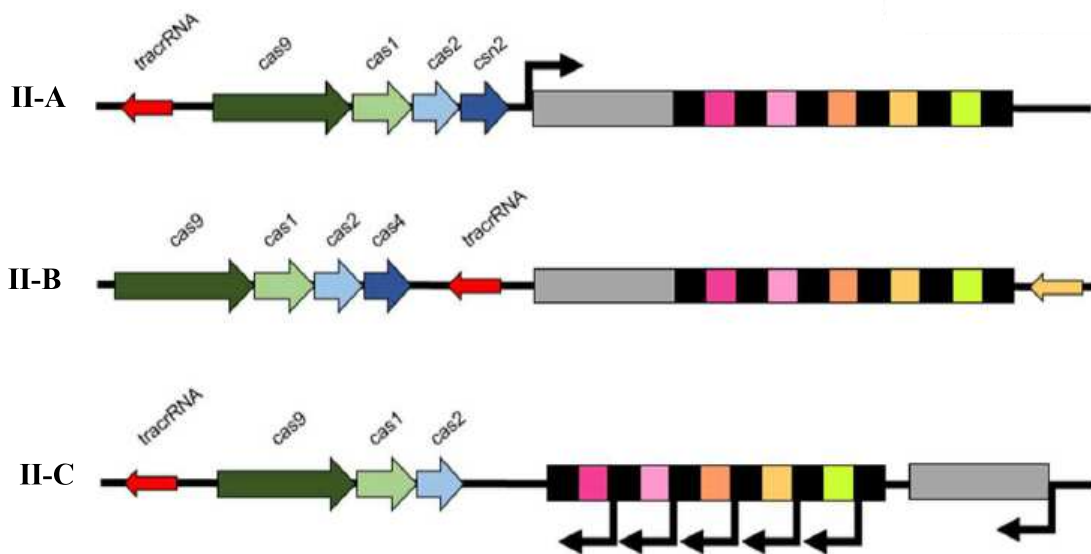


Figure 12. Organisation des loci du système CRISPR-cas de type II. Les loci sont classés en II-A, II-B et II-C sur la base des gènes *Cas* présents. Le type C contient uniquement les gènes *Cas9*, *Cas 1* et *Cas2*. Les types II-A et II-B possèdent un gène *Cas* additionnel appelé respectivement *csn2* et *cas4*.

3.5.6. Fonctionnement du système CRISPR-Cas

Le système CRISPR-Cas déclenche une immunité vis-à-vis d'éléments génétiques mobiles étrangers (Terns and Terns, 2011). Son fonctionnement se décompose en trois étapes clés (**Figure 13**). La première phase, appelée phase d'adaptation, débute après l'infection de la bactérie par un phage. Pendant cette phase, de courts morceaux d'ADN, homologues aux séquences virales ou plasmidiques, sont intégrés dans les loci CRISPR. Cela déclenchera l'insertion d'un *spacer* dérivant de l'ADN viral par exemple. Ce *spacer* confèrera à la bactérie une résistance dirigée contre le phage dont il est issu. La seconde phase correspond à la transcription du locus, aboutissant à l'expression de différents composants du système CRISPR-Cas et à la biogénèse de crARN contenant chacun un *spacer* unique. Enfin, durant la troisième phase dite d'interférences, le crARN conduit la protéine *Cas9*

vers la séquence du *protospacer* complémentaire au crARN, pour assurer son clivage grâce à l'activité nucléasique de la Cas9 (Van Der Oost et al., 2014).

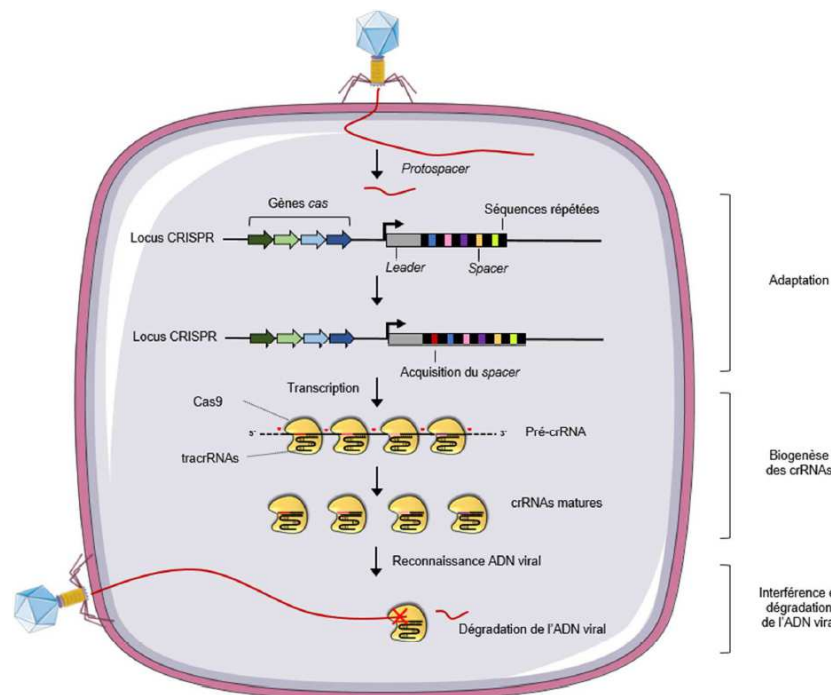


Figure 13. Fonctionnement du système CRISPR-Cas chez la bactérie. Suite à l'introduction dans la cellule d'un ADN étranger issu d'un bactériophage ou d'un plasmide, différentes enzymes Cas vont sélectionner une portion de la séquence étrangère, appelée *protospacer* et l'introduire en tant que nouvelle séquence *spacer* dans le locus CRISPR de la bactérie juste après la séquence leader. Cette phase d'adaptation aboutit à une alternance de *spacers* et de courtes séquences répétées au sein du locus CRISPR. La seconde phase consiste en la biogenèse des crRNA, c'est la transcription du locus CRISPR en un long ARN précurseur, le pré-crRNA, maturé par la RNase III afin de former des crRNA fonctionnels contenant chacun un *spacer* unique. Cette courte séquence d'ARN peut ensuite former un complexe effecteur avec les protéines Cas et reconnaître les éléments génétiques étrangers consécutifs à une infection pour les dégrader.

3.5.7. Le système CRISPR-Cas chez *C. perfringens*

Alors que la présence du système CRISPR-Cas a été démontrée dans 45 % des bactéries et 85 % des archées (Sampson et al., 2013), peu d'études se sont intéressées à sa présence chez *C. perfringens*. En effet, une récente étude effectuée sur 56 génomes de *C. perfringens* isolées de diverses origines, a indiqué que le système CRISPR est absent dans 70 % des souches (Kiu et al., 2017 ; Lacey et al., 2018). Les régions CRISPR sont connues également dans d'autres bactéries comme étant une cible appropriée pour le typage de souches (Delannoy et al., 2012).

3.6. Résistance aux antibiotiques

3.6.1. Résistances naturelles

Très peu de résistances naturelles ont été décrites chez le genre *Clostridium* (Salyers et al., 2004). Parmi celles-ci, on retrouve la résistance aux aminoglycosides (Perreten et al., 2005). Le mécanisme d'entrée de cette classe d'antibiotiques comprend deux phases, l'une ne nécessitant aucun apport d'énergie et l'autre dépendante de l'énergie provenant du système de transport d'électrons utilisant l'oxygène ou l'azote (Boehr et al., 2001). Les bactéries anaérobies strictes ne possédant pas ce système de transport d'électrons, les molécules d'aminoglycosides ne peuvent donc pas entrer dans la cellule bactérienne (Friedman et al., 2004). Malgré leur résistance naturelle aux aminoglycosides, quelques gènes de résistances, notamment les gènes *aph(3')-III*, *ant(6)-Ia* et *sat4*, ont été décrits chez des souches de *C. perfringens* provenant de l'intestin d'un veau (Perreten et al., 2005). Le gène *aph(3')-III* code pour une phosphotransférase, qui catalyse le transfert d'un groupement phosphorylé de l'ATP vers l'un des groupements hydroxyles présents sur la molécule d'aminoglycoside. Cette phosphorylation atténue fortement la liaison de l'antibiotique à sa cible, soit l'ARNr 16S (Jana et Deb, 2006 ; Boehr et al., 2001). Ce gène est impliqué dans la résistance à la gentamicine B, à la kanamycine et à la néomycine (Magnet et Blanchard, 2005). Le gène *ant(6)-Ia*, quant à lui, code pour une nucléotidyltransférase, qui catalyse la réaction entre l'ATP et l'aminoglycoside, formant ainsi l'aminoglycoside o-adenylé. Ceci a pour effet d'atténuer la liaison de l'antibiotique au ribosome (Jana et Deb, 2006). Ce gène est associé à la résistance à la streptomycine (Cerdá et al., 2007). Quant au gène *sat4*, il code pour une acétyltransférase, qui catalyse l'acétylation de l'un des quatre groupements amines de l'antibiotique. L'acétylation réduit l'affinité des aminoglycosides pour son site récepteur de l'ARNt situé sur la sous-unité 30S du ribosome (Perreten et al., 2005). Les trois gènes sont retrouvés sur des éléments transposables et localisés soit sur le chromosome bactérien soit sur des plasmides (Cerdá et al., 2007).

3.6.2. Résistances acquises

Trois grands mécanismes de résistances acquises sont connus chez les bactéries : la présence d'une pompe à flux qui expulse les antimicrobiens à l'extérieur de la bactérie, l'altération ou la protection de la cible, et la modification enzymatique de l'antimicrobien (Van Hoek et al., 2011). Ces

trois mécanismes ont été décrits chez *C. perfringens* pour développer une résistance à la bacitracine, un des antimicrobiens utilisé pour traiter les infections dues à *C. perfringens* chez la volaille et le porc.

D'autres résistances acquises, notamment la résistance aux tétracyclines, ont été décrites chez *C. perfringens*. Une récente étude a indiqué une forte présence des gènes *tetA(P)* et *tetB(P)* dans 75 % (41 sur 56) des souches analysées (Kiu et al., 2017). Avant cela, d'autres études avaient également démontré la présence de gènes de résistance à la tétracycline (Sasaki et al., 2001 ; Gholamiandehkordi et al., 2009).

Les bactéries à Gram positif comme *S. aureus* et *C. perfringens* présentent, au niveau de leur membrane cytoplasmique, un phospholipide dérivé du phosphatidylglycérol modifié par un résidu L-lysine leur conférant une charge globale positive (Nizet, 2006). Cette modification est codée par le gène *mprf* (« *multiple peptide resistance factor* ») codant pour une lysine peptidoglycane (L-PG), un peptide cationique possédant une activité antimicrobienne (Yadav et al., 2017). En effet, la protéine MprF est impliquée dans la résistance à la daptomycine par modification des lipides membranaires. Le gène *mprf* est très présent chez les souches de *C. perfringens* (Kiu et al., 2017).

II – RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

CHAPITRE 1. CARACTERISATION TOXINIQUE ET GENOMIQUE DES SOUCHES DE *C. PERFRINGENS* IMPLIQUEES DANS LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES (TIAC)

1.1. Contexte et objectif

En France, sur la période de 2006 à 2016, *C. perfringens* représentait la quatrième cause de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) d'origine bactérienne avec près de 100 foyers déclarés chaque année touchant plus de 1 500 personnes (Santé publique France, 2016). La virulence de *C. perfringens* est associée à sa capacité à produire des facteurs de virulence composés de toxines et d'enzymes hydrolytiques (Petit et al., 1999). Cette espèce est connue comme étant l'agent pathogène produisant le plus grand nombre de toxines actuellement identifiées (Kiu et al., 2017). Vingt-quatre toxines et enzymes hydrolytiques sont actuellement décrites dans la littérature (Kiu and Hall, 2018; Revitt-Mills et al., 2015). Initialement cinq toxinotypes (A à E) ont été définis sur la base de la production des toxines CPA, CPB, ETX et ITX (Uzal et al., 2014), mais cette classification a été récemment révisée pour inclure deux autres toxinotypes F et G (Rood et al., 2018). Selon la nouvelle classification, les intoxications alimentaires sont associées aux souches de toxinotype F productrices de l'entérotoxine CPE ou « *C. perfringens* enterotoxin ». Cette dernière est considérée par de nombreux auteurs comme étant la toxine responsable de l'apparition des symptômes d'intoxications alimentaires à *C. perfringens* (Brynstad et Granum, 2002; Chon et al., 2012; Freedman et al., 2016; Lindström et al., 2011). Par conséquent la présence des souches productrices de la CPE est donc considérée comme essentielle pour confirmer une TIAC à *C. perfringens* (Brynstad et Granum, 2002).

Actuellement seule la norme NF EN ISO 7937 basée sur le dénombrement de *C. perfringens* est utilisée pour caractériser les toxi-infections alimentaires collectives causées par *C. perfringens* (<https://www.sis.se/api/document/preview/905078/>) (Anonymous, 2004). Cette norme permet de mettre en évidence la présence de *C. perfringens* dans les aliments, mais ne fournit aucune information phénotypique ou génotypique permettant de distinguer les souches isolées et leur potentiel de virulence. D'autre part, seule la détection par la méthode immunochimique d'agglutination sur billes de latex de la CPE dans le fèces des personnes atteintes est un marqueur de l'implication de *C. perfringens* dans la TIAC (Lin et Labbe, 2003). Cette toxine est produite uniquement pendant la phase de sporulation dans les intestins des personnes atteintes et est absente dans

l'aliment (Brynstad et Granum, 2002). De plus, la présence de souches enterotoxinogènes dans les aliments ou dans les selles des malades peut s'accompagner de la présence de souches non-enterotoxinogènes compliquant leur isolement (Scallan et al., 2011). Actuellement, l'utilisation des méthodes PCR pour déterminer le pouvoir toxigène des souches permet uniquement la détection des gènes codant les toxines majeures *cpa*, *cpb*, *cbp2*, *etx*, *iap*, *cpe* et *netB* (Albini et al., 2008; Bailey et al., 2013; Baums et al., 2004; Fach et Popoff, 1997) et la présence des autres facteurs de virulence n'a pu être montrée que par séquençage du génome entier (Kiu et al., 2017).

Ainsi, alors que les génomes de nombreux pathogènes alimentaires ont été intensivement séquencés et étudiés, très peu d'études génomiques ont été menées sur des isolats alimentaires de *C. perfringens*. A ce jour, la plus grande étude génomique réalisée sur une collection de 56 génomes ne comportait que 3 souches d'origine alimentaire. La relation phylogénomique basée sur le core-génome réalisée dans cette étude a permis d'identifier 4 clades bien distincts en corrélation avec les origines des isolats. Avant cela, des études de génomique comparative ont révélé des caractères spécifiques aux souches d'origine humaine en particulier en ce qui concerne les gènes de virulence (Kim et al., 2017). Plus récemment, le séquençage des souches impliquées dans les entérites nécrotiques a permis de démontrer que leur pathogénicité n'est pas associée aux gènes présents dans le core-génome mais plutôt aux gènes présents dans le génome accessoire (Lacey et al., 2018a).

L'objectif de ce travail était d'améliorer les connaissances sur l'épidémiologie des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC. Il visait dans un premier temps à déterminer les profils toxiques des isolats sur la base de la présence ou l'absence des gènes codant tous les facteurs de virulence actuellement connus. Dans un deuxième temps, une reconstruction phylogénomique basée sur le polymorphisme nucléotidique ou « single nucléotide polymorphism » (SNP) du core-génome a été réalisée à partir d'une sélection de souches représentatives de la diversité toxique de notre collection.

1.2. Résumé de l'article

Nous avons réalisé une étude des profils de gènes de virulence sur une collection de 141 souches issues de 42 TIAC survenues en région parisienne entre 2013 et 2017. L'étude des profils a été associée à une reconstruction phylogénomique sur un panel de 58 souches représentatives de notre collection.

Pour cela, nous avons validé 17 couples d'amorces dont 5 issus de la littérature et 12 développés dans le cadre de ses travaux. Cette étude est réalisée par PCRq haut débit en utilisant le système Biomark™ (Fluidigm). Les gènes ciblés sont *cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *ia*, *ib*, *cpe*, *colA*, *pfoA*, *tpel*, *netB*, *lam*, *nagH*, *nanH*, *nanI*, *nanJ* et *cadA*. En plus de ces gènes, une recherche *in silico* par BLAST des gènes *cpd*, *ureABC*, *becA*, *becB*, *netE*, *netF* et *netG* a été réalisée sur les 58 souches représentatives. Sur la base des différents profils de gènes de virulence obtenus, 58 souches représentatives de la collection ont été séquencées permettant d'inférer une phylogénie à partir du core-génome.

Cette étude a révélé une grande diversité des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC puisque 15 profils de gènes de virulence différents ont été obtenus. Des profils hétérogènes (jusqu'à 3) de souches isolées au cours d'une même TIAC ont pu également être mis en évidence indiquant que les TIAC à *C. perfringens* peuvent être associées à une contamination hétérogène de l'aliment. Dans 29 TIAC, les souches isolées possédaient le gène *cpe*. Ces résultats ont confirmé le rôle prépondérant de la CPE sur l'étiologie des TIAC. Cependant, alors que *C. perfringens* a été le seul pathogène dénombré dans l'aliment incriminé, le gène *cpe* n'a pas été détecté dans les souches isolées à partir de 12 TIAC. Ce résultat indique que soit la méthode EN NF ISO 7937 n'est pas en mesure de détecter la souche possédant le gène *cpe*, soit que la CPE n'est pas le seul déterminant du potentiel enterotoxinogène des souches.

La reconstruction phylogénomique a permis une séparation en deux clades, distinguant d'une part les souches *cpe*-positif (*cpe*+) chromosomique et d'autre part les souches *cpe*-positif (*cpe*+) plasmidique et *cpe*-négatif (*cpe*-). Cette information indique une évolution indépendante des souches *cpe*+ et *cpe*- conduisant à l'hypothèse de capacités d'adaptation à des niches environnementales

spécifiques. La confirmation de cette hypothèse pourrait avoir des conséquences importantes en termes de surveillance et de gestion du risque *C. perfringens*.

L'analyse génomique a également fourni d'importantes informations épidémiologiques sur les isolats associés à différentes TIAC. Ainsi, des souches génétiquement identiques et présentant des profils de gènes de virulence communs ont été isolées de TIAC différentes révélant un lien épidémiologique insoupçonné et suggérant une même source de contamination. Cette étude donne un aperçu du potentiel des approches génomiques pour la caractérisation de *C. perfringens* impliqués dans les TIAC.

1.3. Article

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans le journal *Frontiers in Microbiology* : **Large-scale Genomic Analyses and Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Implicated in Foodborne Outbreaks in France** (Abdelrahim et *al.*, 2019).

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00777/abstract>



Large-Scale Genomic Analyses and Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Implicated in Foodborne Outbreaks in France

Abakabir Mahamat Abdelrahim, Nicolas Radomski, Sabine Delannoy, Sofia Djellal, Marylène Le Négrate, Katia Hadjab, Patrick Fach, Jacques-Antoine Hennekinne, Michel-Yves Mistou and Olivier Firmesse*

Université PARIS-EST, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Panagiotis Skandamis,
Agricultural University of Athens,
Greece

Reviewed by:

Jihong Li,
University of Pittsburgh, United States
Georges Daube,
University of Liège, Belgium

*Correspondence:

Olivier Firmesse
olivier.firmesse@anses.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 July 2018

Accepted: 26 March 2019

Published: 17 April 2019

Citation:

Mahamat Abdelrahim A,
Radomski N, Delannoy S, Djellal S,
Le Négrate M, Hadjab K, Fach P,
Hennekinne J-A, Mistou M-Y and
Firmesse O (2019) Large-Scale
Genomic Analyses and Toxinotyping
of *Clostridium perfringens* Implicated
in Foodborne Outbreaks in France.
Front. Microbiol. 10:777.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00777

Clostridium perfringens is both an ubiquitous environmental bacterium and the fourth most common causative agent of foodborne outbreaks (FBOs) in France and Europe. These outbreaks are known to be caused by *C. perfringens* enterotoxin (CPE) encoded by the *cpe* gene. However, additional information on the toxin/virulence gene content of *C. perfringens* has become available in the last few years. Therefore, to understand the enteropathogenicity of this bacterium, we need to describe the toxin and virulence genes content of strains involved in FBOs. In this study, we used a new real-time PCR typing technique based on a comprehensive set of 17 genes encoding virulence factors. The analysis was performed on a collection of 141 strains involved in 42 FBOs in the Paris region. It was combined with whole genome sequence (WGS) phylogenomic reconstruction, based on the coregenome single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 58 isolates, representatives of the identified virulence gene profiles. Two or three different virulence gene profiles were detected in 10 FBOs, demonstrating that *C. perfringens* FBOs may be associated with heterogeneous strains. *cpe*-positive strains were isolated in 23 outbreaks, confirming the prominent role of CPE in pathogenicity. However, while *C. perfringens* was the sole pathogen isolated from the incriminated food, the *cpe* gene was not detected in strains related to 13 outbreaks. This result indicates either that the standard method was not able to isolate *cpe*+ strains or that the *cpe* gene may not be the only determinant of the enterotoxigenic potential of *C. perfringens* strains. Using phylogenomic reconstruction, we identified two clades distinguishing chromosomal *cpe*-positive from *cpe*-negative and plasmid-borne *cpe*. Important epidemiological information was also garnered from this phylogenomic reconstruction that revealed unexpected links between different outbreaks associated with closely related strains (seven SNP differences) and having common virulence gene profiles. This study provides new insight into the characterization of foodborne *C. perfringens* and highlights the potential of WGS for the investigation of FBOs.

Keywords: foodborne outbreak, *Clostridium perfringens* enterotoxin, virulence gene profiles, virulence factors, real-time PCR, whole genome sequencing, coregenome SNP

INTRODUCTION

Clostridium perfringens is a Gram-positive, spore-forming, anaerobic, rod-shaped bacterium, known as an important causative agent of foodborne and non-foodborne gastroenteritis (Grass et al., 2013). The ability of this bacterium to form resistant spores contributes to its survival in many environmental niches, including soil, sewage, foods, and the intestinal microbiota of humans and animals (Xiao, 2014; Li et al., 2016). *C. perfringens* can cause necrotic enteritis, enterotoxemia, and gastroenteritis in animals (Keyburn et al., 2008; Uzal et al., 2015). It is also a foodborne pathogen that causes diarrhea and abdominal pain in humans (Scallan et al., 2011). *C. perfringens* is commonly found as a contaminant in meat and poultry products, as well as in vegetables and crops. This bacterium is an important pathogen involved in foodborne outbreaks (FBOs) and ranks as the fourth most common causative agent of foodborne illness due to bacterial toxins in France and Europe, with more than 1,500 human cases each year (EFSA, 2016). The pathogenicity of this bacterium is largely attributable to its ability to produce a variety of virulence factors. These virulence factors include well-characterized pathogenic toxins and hydrolytic enzymes. Their roles in FBO remain to be defined but their presence is an aggravating factor (Li et al., 2016). Toxin production varies among *C. perfringens* strains and is the basis for the classification system, which is based on the production of four major toxins, namely CPA, CPB, ETX, and ITX that divide *C. perfringens* strains into toxinotypes A to E (McClane et al., 2013). This classification was recently revised to include two additional toxinotypes, i.e., *C. perfringens* toxinotype F strains producing enterotoxin (CPE) but not CPB, ETX or ITX, and *C. perfringens* toxinotype G strains producing NetB (Rood et al., 2018) (Table 1). The number of characterized virulence factors is constantly increasing, with more than 20 toxins and hydrolytic enzymes identified to date (Li et al., 2016; Kiu and Hall, 2018). However, there is considerable variability in the toxin armamentarium, and a single strain cannot produce all these virulence factors (Freedman et al., 2016). The virulence factors of *C. perfringens* can be classified functionally as membrane-damaging enzymes, pore-forming toxins, intracellular toxins, and hydrolytic enzymes (Revitt-Mills et al., 2015). Genes encoding these virulence factors may be located on the chromosome, and on the large plasmid (Freedman et al., 2016). Chromosomal virulence factors include the *cpa* gene (encoding α -toxin), *colA* (κ -toxin), *pfoA* (θ -toxin), and *nagH* (hyaluronidase or μ -toxin). These genes are located on the variable region of the chromosome (Chalmers et al., 2008a). The *nanH*, *nanI*, and *nanJ* genes encoding different sialidases, and *cadA* encoding ν -toxin are located on a conserved region of the chromosome (Obana and Nakamura, 2011). The genes *cpb* (encoding CPB-toxin), *cpb2* (CPB2-toxin), *etx* (ETX-toxin), *ia/ib* (ITX-toxin), *netB* (NetB-toxin), *tpeL* (TpeL-toxin), *ureABC* (ureases), *cpd* (δ -toxin), *lam* (λ -toxin), and *becA/becB* encoding the binary enterotoxin for *C. perfringens* are located on large plasmids of variable size ranging from 65 to 110 kb (Li et al., 2013). Recently, partial genome sequencing of the canine isolate revealed three novel putative toxin genes encoding proteins related to the

TABLE 1 | Revised classification of *C. perfringens* based on the production of six major toxins (Rood et al., 2018).

Type	Toxin produced					
	α (CPA)	β (CPB)	ϵ (ETX)	ι (ITX)	CPE	NetB
A	+	–	–	–	–	–
B	+	+	+	–	–	–
C	+	+	–	–	±	–
D	+	–	+	–	±	–
E	+	–	–	+	±	–
F	+	–	–	–	+	–
G	+	–	–	–	–	+

+, toxin produced; –, toxin not produced.

pore-forming leucocidin/hemolysin family. These putative toxin genes were designated *netE*, *netF*, and *netG* (Mehdizadeh Gohari et al., 2015). *netE* and *netF* are located on a large conjugative plasmid, and *netG* is located on another large plasmid (Mehdizadeh Gohari et al., 2017). The *C. perfringens* enterotoxin gene (*cpe*) can be located on either the chromosome or on the plasmid (Gao and McClane, 2012). A strain harboring both a chromosomal and plasmid-borne *cpe* gene has not yet been observed (Freedman et al., 2016). *C. perfringens* enterotoxin (CPE) is one of the toxins associated with sporulation and has been implicated in FBOs and non-foodborne gastroenteritis illnesses (Lukinmaa et al., 2002).

The Standardized method NF EN ISO 7937 is the conventional method for detecting *C. perfringens* strains in foods by the enumeration of bacterial colonies on specific agar media (Anonymous, 2005). With this robust method, it is possible to detect and enumerate viable *C. perfringens* in food samples and to obtain isolates that can be characterized further. This reference method therefore makes it possible to isolate the bacterium but does not provide any phenotypic information distinguishing the strains from one another, particularly with regards to their virulence (Law et al., 2015). While the detection of CPE in the stools of patients is a marker for implicating *C. perfringens* as the etiological agent in foodborne illnesses, CPE is produced in the intestine during sporulation of vegetative cells and is consequently absent from the contaminated food (Lin and Labbe, 2003). Moreover, isolation of *cpe*-positive *C. perfringens* in suspected foods and from stools of affected individuals may be accompanied by the presence of *cpe*-negative *C. perfringens* from the environment and microbiota (Scallan et al., 2011). This situation makes toxin detection hazardous to link isolates from patients to food vehicles (Lindstr m et al., 2011). The common assumption that the intestinal pathogenicity of *C. perfringens* relies on a specific toxin was recently challenged by findings suggesting that additional virulence factors may be involved in cytotoxicity (Yasugi et al., 2015). This prompted us to explore the virulence potential of *C. perfringens*, taking into account the more recently described virulence factors and phylogenomic inference presenting high discrimination power.

To improve epidemiologic knowledge about *C. perfringens* involved in FBOs, we developed a new real-time PCR typing

technique targeting 17 genes encoding 15 virulence factors. The method was applied to 141 *C. perfringens* FBO strains isolated in the Paris region between 2013 and 2017. The virulence gene profiles obtained by this method would make it possible to describe strain diversity with regards to the *cpe* gene among these outbreaks, and robust phylogenomic analysis based on whole genome sequencing (WGS) data (Felten et al., 2017) would enable us to determine phylogenomic diversity at a large genomic scale, as recently emphasized (Kiu et al., 2017).

While many food pathogens have been sequenced and studied extensively, limited genome sequence data for *C. perfringens* are available in public databases, and very few genomic studies have been conducted on food isolates (Shimizu et al., 2002; Myers et al., 2006; Mehdizadeh Gohari et al., 2017; Lacey et al., 2018). To our knowledge, the largest genomic study conducted on 56 *C. perfringens* genomes contained only three foodborne strains (Kiu et al., 2017). Genomic comparison previously conducted on 12 strains from different toxinotypes, isolated from different sources, highlighted a lack of features differentiating toxinotype A from the other isolates, indicating that toxinotype A can easily shift to other types by acquisition of toxin-encoding plasmids (Hassan et al., 2015). A recent genomic study conducted on necrotic enteritis-causing isolates of *C. perfringens* demonstrated that pathogenicity does not correlate with coregenome content, but rather with accessory gene content located on the chromosome and plasmids (Lacey et al., 2018). To better understand the diversity among *C. perfringens* implicated in FBOs, we performed whole genome analysis on 58 *C. perfringens* strains selected on the basis of epidemiologic information and diversity of virulence gene profiles.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological and Epidemiological Data on Foodborne Outbreaks Associated With *C. perfringens* in the Paris Region

The microbiological and epidemiological data concerning each FBO (i.e., number of human cases, location, symptoms, and type of incriminated food) were collected by interviews or questionnaires managed by the local health authorities. The incriminated food was collected and sent to laboratories at ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety) for microbiological analysis. We studied a collection of 141 isolates of *C. perfringens* involved in 42 FBOs from 2013 to 2017, including 1,267 human cases. Bacterial strains were isolated from suspected food by plating on selective Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) media according to the EN NF ISO 7937 standard method. The level of contamination by *C. perfringens* in the implicated foods was between 3.0×10^1 and 1.0×10^6 cfu/g. *C. perfringens* was isolated from 10 outbreaks in association with other bacterial species (including *B. cereus* and *S. aureus*) during microbiological investigations. Overall, vegetable dishes were the most common food reported (15 outbreaks, 36%), followed by poultry (10 outbreaks, 24%). Pork

and beef sources were involved in practically the same proportion (six outbreaks, 14% for each) as other sources (five outbreaks, 12%) (Table 2).

DNA Extraction

With the aim of obtaining DNA for PCR and WGS-based applications, isolates of *C. perfringens* were revived from a frozen stored culture (-20°C) and anaerobically inoculated for 24 h at 37°C in Thioglycolate Broth with Resazurin® (bioM rieux, Marcy l'Etoile, France). The subsequent culture was streaked on Columbia agar with 5% sheep blood (bioM rieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated for 24 h at 37°C under anaerobic conditions using a Genbox anaer sachet® (bioM rieux, Marcy l'Etoile, France).

Concerning PCR-based applications, DNA extraction was performed using the InstaGene kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), following the manufacturer's instructions for Gram-positive bacteria. For each culture, cells were washed by centrifugation at $17,000 \times g$ for 3 min in 1 mL of phosphate buffer solution (PBS). The cell pellet was resuspended in 200 μL of Chelex-based solution and heated for 20 min at 56°C and then at 100°C for 10 min. The DNA solution was cooled for 5 min, and centrifuged at $17,000 \times g$ for 3 min to eliminate cell debris. The purity of the extracted DNA solution was assessed using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Villebon, France), according to the instructions provided by the manufacturer. The ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm was used to assess protein contamination, while the ratio of absorbance at 260 nm and 230 nm was estimated to assess phenol contamination. The standard for purity was an A_{260}/A_{280} ratio between 1.8 and 2.2, and an A_{260}/A_{230} ratio between 2.0 and 2.2. The DNA was then diluted to obtain 3.3×10^2 ng/ μL , corresponding to 10^5 genome equivalents. DNA solutions were stored at -20°C for further PCR analysis.

Concerning WGS-based applications, DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Charbonni res-les-Bains, France), according to the manufacturer's instructions. Culture conditions and assessment of the quality and quantity of extracted DNA were performed as described above. Before library preparation, 200 ng of genomic DNA were analyzed on 0.8% agarose gel to ensure the absence of RNA contamination and DNA degradation.

PCR Conditions

The BioMark™ real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, CA, United States) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using the 192×24 dynamic array (Fluidigm, San Francisco CA, United States). This chip dispenses 24 PCR mixes and 192 samples into individual wells, after which on-chip microfluidics assemble PCR reactions in individual chambers prior to thermal cycling resulting in 4,608 reactions.

Amplifications were performed using EvaGreen DNA binding dye (Biotium Inc., Hayward, CA, United States) with Perfecta qPCR tough mix (Quanta bio, Beverly, MA, United States), in accordance with the manufacturer's recommendations. Three microliters of sample mix (containing 1.47 μL perfecta qPCR tough mix, 0.15 μL DNA binding dye sample loading reagent,

TABLE 2 | Microbiologic data for FBOs associated with *C. perfringens* from the Paris region between 2013 and 2017.

FBO	Year	Food vehicle	Human cases (n)	cfu/g	Pattern identified (n)	Virulence gene profile (pattern)	Recovered strain (n)	Other identified FBO bacteria	cfu/g
2207	2013	Vegetable	130	3.7E+06	1	XIII	1	—	—
2253	2013	Poultry	160	6.0E+06	1	XIII	1	—	—
435	2014	Other	22	3.0E+02	1	IV	1	—	—
1601	2014	Other	15	3.5E+05	1	IV	1	BC	2.7E+04
1622	2014	Other	21	1.1E+04	1	VIII	1	—	—
2370	2014	Pork	27	2.6E+03	1	V	1	—	—
529	2015	Vegetable	6	3.0E+01	2	X; IX	2	BC	1.5E+03
538	2015	Poultry	38	1.5E+04	1	V	7	—	—
2291	2015	Pork	118	4.0E+06	1	V	5	—	—
2318	2015	Poultry	34	1.1E+03	1	V	1	—	—
2540	2015	Vegetable	9	4.0E+02	2	VIII; X	2	BC	8.0E+03
2606	2015	Vegetable	9	3.7E+02	2	VIII; X	5	BC	1.0E+05
00000	2015	NK	5	NK	2	VIII; XIV	5	NK	NK
2727	2015	Pork	7	3.7E+03	2	IV; X	3	—	—
2773	2015	Poultry	50	1.5E+07	1	VII	5	—	—
2774	2015	Poultry	50	1.5E+07	1	VII	5	—	—
2987	2015	Poultry	39	3.6E+04	1	VII	8	—	—
2988	2015	Poultry	39	1.4E+02	2	VII; X	4	BC	1.4E+05
3803	2015	Pork	4	1.3E+04	2	X; XI	4	SCP	4.0E+02
3958	2015	Pork	NK	1.6E+02	1	XI	5	—	—
3863	2015	Vegetable	20	2.2E+02	3	VII; XIII; XV	5	—	—
4068	2015	Other	2	4.0E+04	1	X	2	—	—
4092	2015	Beef	30	1.2E+02	1	IV	4	—	—
4115	2015	Vegetable	2	3.6E+01	2	X; XI	2	—	—
4127	2015	Pork	26	5.8E+05	1	VI	4	—	—
4138	2016	Other	1	6.0E+02	1	X	3	—	—
370	2016	Vegetable	8	4.0E+01	1	III	1	BC	1.0E+03
490	2016	Poultry	40	7.0E+01	1	V	5	—	—
553	2016	NK	4	8.0E+02	1	XI	1	—	—
1781	2016	Vegetable	28	1.1E+05	1	XI	5	—	—
1782	2016	Vegetable	28	4.0E+01	1	XI	1	BC	5.5E+04
1923	2016	Vegetable	13	8.4E+04	1	VII	5	—	—
3199	2016	Vegetable	5	4.0E+01	1	X	1	—	—
3566	2016	Vegetable	51	2.4E+06	1	IV	5	—	—
4286	2016	Vegetable	2	4.0E+01	1	I	1	BC	4.0E+03
4430	2016	Beef	2	1.1E+03	1	VII	5	—	—
4493	2017	Vegetable	2	3.6E+02	3	X; XI; XII	4	BC	1.5E+04
4755	2017	Vegetable	120	9.3E+02	1	V	5	—	—
274	2017	Beef	2	4.0E+02	1	X	1	—	—
759	2017	Beef	31	4.9E+06	1	II	5	—	—
762	2017	Beef	31	7.0E+01	1	II	4	—	—
1270	2017	Beef	41	1.9E+03	1	X	5	—	—

BC, *Bacillus cereus*; SCP, coagulase-positive *Staphylococcus aureus*; NK, not known.

0.15 μ L EvaGreen, 0.06 μ L Rox reference dye, 0.76 μ L DNA, and 0.41 μ L DNase free water) were loaded into each sample inlet of the dynamic chip. Three μ L of primer mix (containing 1.5 μ L assay loading reagent, 0.75 μ L primer stock containing 20 μ M of each primer and 0.75 μ L DNase free water) were loaded into each assay inlet of the dynamic chip. The thermal profile comprised 10 min at 95°C (Taq polymerase activation), followed by 35 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min (amplification

steps), followed by melting curve analysis. The assays were performed in duplicate. Data were acquired on the BioMark™ Real-Time PCR system and analyzed using Fluidigm Real-time PCR Analysis software to obtain crossing point (Ct) values. Two negative controls (no template controls) were included per chip and a pool of DNA for reference strains. CIP106156 known to be positive for the *cpa*, *cpe*, *ia*, *ib*, *pfoA*, *colA*, *lam*, *nagH*, *nanH*, *nanI*, *nanJ*, and *cadA* genes, CIP106527 positive for the *cpb1* and

tpeL genes, and CIP104612 positive for the *cpb2* gene were used as positive controls. Targeted genes and corresponding primers are listed in **Table 3**.

Strain Selection for WGS

Fifty-eight strains representative of all toxin gene profiles in all FBOs were selected for WGS. Additional isolates were selected to confirm the specificity and sensitivity of the PCR method to detect the 17 virulence genes. Three contaminated DNA samples of profile I (FBO 4286), profile X (FBO 2606), and profile XIV (FBO, NK) were removed from WGS analysis.

Read Quality Check and Assembly

The genome sequencing was performed by the 'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière' (ICM)¹ (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris) using NextEra XT libraries (Illumina, San

Diego, CA, United States), indexed following the manufacturer's recommendations (Illumina, San Diego, CA, United States), purified with the Agencourt AMPure XP system (Beckman Coulter), and controlled with Microfluidic Labchip GX (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette). These libraries were sequenced with a NextSeq 500 sequencer (Illumina, paired-end reads of 150 bases each). Assembly and variant calling of genomes were performed with an in-house workflow called ARTWork. Briefly, Paired-end reads stored as fastq.gz files were decompressed and BBDMap (Bushnell, 2014) was used in order to estimate deep coverage. The reads with depth coverage lower than 20× were discarded from the workflow. Those higher than 100× were normalized at 100× using BBNorm (Xu et al., 2015). The quality of paired-end reads was evaluated with FASQC software v0.11.2. FASQC reports were produced for each sample of retained reads. Trimmomatic was used to trim reads less than 50 bp in length and bases presenting a phred score less than 20 (Bolger et al., 2014). The closest related reference genome

¹www.icm-institute.org

TABLE 3 | Primers used for the detection of 17 genes encoding 15 virulence factors.

Gene	Primer name	Sequence	References	Primer length	Amplicon (bp)
cpa	CPALPHOTOX1 TM-F	AAGAACTAGTAGCTTACATATCAACTAGTGGTG	Albini et al., 2008	33	124
	CPALPHOTOX1 TM-R	TTTCCTGGGTGTGTCATTCC		21	
cpb	CPBEATOX-F	TGGAGCGTGAAAGAACTGTTATTA	Albini et al., 2008	25	85
	CPBEATOX-R	GGTATCAAAGCTAGCCTGGAATAGA		26	
cpb2	CPBEA2TOX-F	TATTTCAAAGTTTACTGTAATTTTATGTTTCA	Albini et al., 2008	34	127
	CPBEA2TOX-R	CCATTACCTTTCTATAAGCGTCGATT		26	
etx	CPETOXINTM-F	TTTGATAAGGTTACTATAAATCCACAAGGA	Albini et al., 2008	30	121
	CPETOXINTM-R	AGAGAGCTTTTCCAAACATAAACATCTTC		28	
iap	CPIOTATM-F	GCATTAAAGCTCACACCTATTCCA	Albini et al., 2008	24	85
	CPIOTATM-R	GAGATGTGAGAGTTAATCCAAATTCTTG		28	
ibp	ibp-F	AGTTCGAAGTGACCAAGAAATAC	This study	23	182
	ibp-R	CCTGAATATTGCAAAGTTGCTTC		23	
cpe	cpe-F	ATAGATAAAGGAGATGGTTGGA	This study	22	178
	cpe-R	CCATATTCTACAGATGCTTGTA		22	
pfoA	pfoA-F	TGGAGCCTATGTTGCACAGT	This study	20	211
	pfoA-R	ATCTCTCCACCATTCCTCAAG		20	
netB	netB-F	ACCGCTTCACATAAAGGTTGG	This study	21	160
	netB-R	TCAGGCCATTTCATTTTCCGT		22	
tpeL	tpeL-F	GTGCCAATTGCAGGTATATCAAG	This study	23	247
	tpeL-R	ATCCTCCTTCCATTGCCATA		21	
colA	colA-L	GGGCTTCAAAGGAAGTTAAGG	This study	21	220
	colA-R	TACTTCTCTGTTGTTCTTTCA		23	
lam	lam-F	CTGCAGTGAGCGCACATAGT	This study	20	231
	lam-R	CTCACTGCAGCTGGATCATTT		21	
nagH	nagH-F	TCATGGAGAATATATTGGGGTTA	This study	23	122
	nagH-R	TCCACTCAACACCATTCATAG		21	
cadA	cadA-F	AGATGCAGCCATAGAAGCTG	This study	20	198
	cadA-R	ACATCTCCAAATACAGCTTCC		21	
nanH	nanH-L	GGATAATGGTGAAACATGGAC	This study	21	117
	nanH-R	CCAGAGTAATCATATCTTTGTAC		22	
nanI	nanI-F	AAGGTAAACAATCTAGTGCTGT	This study	22	82
	nanI-R	TCTATTATCATTTGGAGATTCTC		23	
nanJ	nanJ-F	TGTTTATAAAACACAACCAAGTAG	This study	23	122
	nanJ-R	CATCTATAGAAGCTAAACCGT		22	

of each sample was identified by estimating the Jaccard index (Ondov et al., 2016) against a collection of closest reference genomes (**Supplementary Material**) and was further used to perform scaffolding with MeDuSa (Bosi et al., 2015) and gap filling with GMcloser (Kosugi et al., 2015). The scaffolds of less than 200 bp in length were trimmed with Biopython (Cock et al., 2009). The quality of assemblies was assessed using QUAST metrics (Gurevich et al., 2013). Overall, the genomes showed the expected GC content of 28% and most of the contigs could be organized into single scaffolds. The sizes of the largest scaffolds ranged from 2.6 to 3.33 Mbp, with an average of 3.0 Mbp, in perfect agreement with the expected 3.0 Mbp size of the *C. perfringens* genome (**Supplementary Material**).

Variant Calling Analysis

Also implemented in the ARTwork workflow, a variant calling analysis was performed using the iVARCall2 workflow (Felten et al., 2017), an in-house variant caller previously published and based on the HaplotypeCaller algorithm able to call single nucleotide polymorphisms (SNPs) and small insertions/deletions (InDels) at the coregenome scale simultaneously, and for each genome independently. The iVARCall2 workflow produces g.VCF files for each genome, which can be filtered and merged in order to produce high-quality variants and related pseudogenomes (i.e., VCFtoPseudogenome script). This pseudogenome corresponds to the reference genome where the genotypes of detected variants are replaced in each genome of the dataset. At the end of the iVARCall2 workflow, reports on breadth and depth coverage were produced, as well as matrices of pairwise distances. To assess quality of variant calling (Sandmann et al., 2017), mapping against the reference genome ATCC13124 was performed and resulted in breadth and depth coverages of $84 \pm 7\%$ and $389 \times$, respectively.

Coregenome Phylogenomic Inference

A maximum likelihood (ML) coregenome phylogenomic tree based on the pseudogenomes was constructed using the general time-reversible model with gamma distributed sites (GTRGAMMA), the secondary structure 16-state model, and a bootstrap analysis ($n = 100$) implemented in RaxML (Stamatakis, 2015). A total of 59,593 coregenome SNPs within 902 conserved core genes in all 58 genomes were identified in the dataset. Interactive Tree of Life (iTOL) was used to visualize the tree and annotate metadata (Letunic and Bork, 2016). In order to estimate the number of replicates necessary to yield accurate confidence values, a posterior bootstrap convergence test was computed with RAxML (Pattengale et al., 2010).

In silico Detection of Virulence Factors

The coding sequences (CDSs) of 24 genes (including *becA*, *becB*, *ureABC*, and *cpd*) encoding virulence factors were retrieved from NCBI and queried against the 58 assembled genomes using nucleotide BLAST (identity = 90%; minimum coverage = 85%) to investigate the presence of these genes and confirm the results obtained by real-time PCR amplification.

Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted in R studio (version 2017-03-06). A Shapiro–Wilk test was performed to assess the normality of data, and a non-parametric Kolmogorov–Smirnov test was used to compare the diversity between phylogroups (Veshnyakova et al., 2012). The associations between different genes were tested using a Spearman's rank correlation test (Myers and Sirois, 2004). The difference between the number of genes detected in *cpe*-positive strains and *cpe*-negative strains was tested using the Wilcoxon Rank Sum test (Rey and Neuhäuser, 2011).

RESULTS

Distribution of Genes Encoding Virulence Factors Among *C. perfringens* Food Isolates

We successfully applied real-time PCR targeting 17 genes encoding 15 toxins or virulence factors on all 141 *C. perfringens* strains from 42 FBOs in order to discriminate virulence gene profiles. The distribution of genes encoding virulence factors shown in **Table 4** was diverse among *C. perfringens* food strains. Four genes encoding virulence factors including *cpa*, *colA*, *nanH* and *cadA* were conserved in all tested isolates and were not included in **Table 4**. Similarly, the *cpb*, *etx*, *netB* and *tpeL* genes were not detected in any of the analyzed strains and were therefore excluded from **Table 4**. According to the new toxin-based classification system (Rood et al., 2018), toxinotype F was the most prevalent and represented 79 strains (56%). Sixty-one strains were classified as toxinotype A and only one strain belonged to toxinotype E. However, our analysis provided a much more contrasted view of the foodborne strains. In total, 15 virulence gene profiles from I to XV were obtained. The strains harbored 4 (profile XV) to 11 (profile I) virulence genes. Six profiles of virulence genes (I, III, IX, XII, XIV, and XV) were represented by only one strain. Interestingly, profile I was represented by a strain belonging to *C. perfringens* type E (i.e., presence of the *ia* and *ib* genes encoding iota toxin).

CPE is considered by many authors as the sole toxin responsible for the symptoms occurring during foodborne illness caused by *C. perfringens* (Brynstad and Granum, 2002; Lindström et al., 2011; Chon et al., 2012; Freedman et al., 2016). Consequently, we paid particular attention to the distribution of the *cpe* gene in our collection of strains (**Table 4**). In total, 80 strains were positive for the *cpe* gene and 61 were *cpe*-negative. The distributions of virulence genes were different according to the presence or absence of the *cpe* gene. Four profiles (IX, XI, XII, and XIV) with a combination of genes encoding virulence factors were detected only in *cpe*-negative strains. Conversely, three profiles (I, IV, and VI), which contain a combination of genes encoding virulence factors, were only detected in *cpe*-positive strains. Four profiles (II/VIII, III/X, V/XIII and VII/XV) were identical between *cpe*-negative and *cpe*-positive strains.

A significant trend emerged from the comparative analysis of *cpe*-positive vs. *cpe*-negative strains: 80% (49/61) of *cpe*-negative

TABLE 4 | Profiles of virulence genes identified in *C. perfringens* strains isolated in the Paris region from 2013 to 2017 ($n = 141$).

Virulence gene profile	Number of strains	Genes detected									Toxinotype
		<i>cpb2</i>	<i>ia</i>	<i>lb</i>	<i>cpe</i>	<i>pfoA</i>	<i>lam</i>	<i>nagH</i>	<i>nanI</i>	<i>nanJ</i>	
I	1	–	+	+	+	+	–	+	+	+	E
II	9	+	–	–	+	+	–	+	+	+	F
III	1	–	–	–	+	+	–	+	+	+	F
IV	12	–	–	–	+	–	–	+	–	+	F
V	24	–	–	–	+	–	–	+	–	–	F
VI	4	–	–	–	+	–	–	–	–	+	F
VII	29	–	–	–	+	–	–	–	–	–	F
VIII	7	+	–	–	–	+	–	+	+	+	A
IX	1	+	–	–	–	+	–	–	+	–	A
X	40	–	–	–	–	+	–	+	+	+	A
XI	5	–	–	–	–	–	–	+	+	+	A
XII	1	–	–	–	–	+	–	–	+	–	A
XIII	5	–	–	–	–	–	–	+	–	–	A
XIV	1	+	–	–	–	+	+	+	+	+	A
XV	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A

The column toxinotype refers to the new toxin-based typing scheme (Rood et al., 2018). +, presence of gene; –, absence of gene.

strains carried 8 to 10 virulence genes, while 86% (69/80) of *cpe*-positive strains carried only five to seven virulence genes ($p < 0.05$). The biological relevance of this observation can be assessed by performing *in vitro* cytotoxicity tests. Profile VII was the most common among *cpe*-positive strains (36%) and lacks all the other genes encoding virulence factors. Importantly, *C. perfringens* was the only pathogen identified in five of seven outbreaks where profile VII was detected, confirming the prominent role of CPE in pathogenicity. On the other hand, virulence gene profile X was the most prevalent among *cpe*-negative *C. perfringens* strains (66%, 40/61). Profile X carried the *pfoA*, *nagH*, *nanI*, and *nanJ* genes. The gene encoding perfringolysin O (*pfoA*), a well characterized pore-forming toxin, was found in 82% (50/61) of *cpe*-negative *C. perfringens* strains and was associated with hyaluronidases genes (*nagH*) in 48 of the 50 *cpe*-negative *pfoA*-positive strains. The Sialidase genes (*nanI* and *nanJ*) were also found predominantly in *cpe*-negative strains (87%, 53/61). An interesting finding is shown in **Table 4**: *nagH* is the only virulence gene present in profile XIII, which was the only strain isolated in large FBOs (outbreaks 2207 and 2253), suggesting that NagH could be a marker of the enterotoxigenic potential of *cpe*-negative strains. This hypothesis is compatible with the epidemiologic characteristics of *nagH* *cpe*-negative strains (profiles IX, XII, and XV), which were always found to be associated with *nagH*-positive profiles in the investigated outbreaks. However, this result could also be due to a fastest growth rate in food that could make *cpe*+ strains undetectable. This hypothesis could be tested experimentally in competition growth assays. In addition and to clarify the potential pathogenicity of *cpe*-strains it would be interesting to perform PCR targeting the *cpe* gene on DNA extracted directly from the food mother suspension. The development of such a PCR test made on food suspension would complement the standard microbiological detection method.

Profiles of Virulence Genes per Foodborne Outbreak

To explore the genetic diversity within the strains isolated in the same outbreak, we considered the 29 FBOs for which at least two to eight *C. perfringens* isolates per outbreak were recovered. A FBO is considered to be heterogeneous when two or more recovered isolates show different virulence gene profiles. Several profiles of virulence genes (i.e., up to three different profiles) were retrieved from 10 outbreaks. In addition, the *cpe* gene was not detected in seven of the 10 heterogeneous FBOs (outbreaks 2540, 2606, NK, 3803, 4115, 4493, and 529) (**Table 2**). *C. perfringens* was the sole pathogen identified in two outbreaks.

The isolated strains had homogeneous virulence gene profiles in 19 FBOs. The *cpe* gene was found to be present in 14 of the 19 homogeneous FBOs. In addition, *C. perfringens* was the only pathogen isolated in all homogeneous FBOs in which the *cpe* gene was detected. Among the homogeneous FBOs with *cpe*-positive strain profiles, profiles V and VII were the most commonly detected in nine out of 14 FBOs. Conversely, the *cpe* gene was not detected in 5 FBOs with homogeneous profiles of virulence genes.

Finally, only *cpe*-negative *C. perfringens* isolates were detected in 12 out of 42 FBOs using the horizontal method EN NF ISO 7937 for the enumeration of *C. perfringens* (Anonymous, 2005). This observation does not prove the pathogenicity of these strains since other pathogens may have escaped detection. However, we cannot exclude the possibility that *cpe*-negative *C. perfringens* isolates may have played a role in the diseases.

Phylogenomic Inference

Our PCR-based analysis focusing on the virulence gene profiles shows that our collection of FBO-associated *C. perfringens* strains

is segmented into two genetically distinct clusters, namely *cpe*-positive and *cpe*-negative strains. In order to check the results obtained by PCR, we performed a whole genome analysis of strains representative of the diversity of the dataset. The study of genetic relationships was based on coregenome SNPs and the maximum-likelihood method to provide a strong phylogenetic analysis. The tree was robust with most branches of the backbone presenting high bootstraps values. Strikingly, two distinct clades were identified that distinguish most *cpe*-positive strains (24/27) from *cpe*-negative strains (27/30) (Figure 1). A closer examination of the genomic environment of the *cpe* locus in the 3 *cpe*-positive strains (16SBCL585, 17SBCL79, and 17SBCL85), which clustered in the *cpe*-negative clade, revealed that it is flanked by a putative cytosine methyltransferase gene (*dcm*) and two insertion sequences IS1469 and IS1470-like found in a 70 kb scaffold (Figure 2). By BLAST querying against plasmid NCBI database, we found 99.9% identity with plasmid pCPF4969 (Adams et al., 2015, 2018). This result indicates that the *cpe* gene is carried on a the pCPF4969 plasmid (Li et al., 2013).

A similar analysis performed among 24 *cpe*-positive strains identified seven different *cpe* loci which were all found in the 3.0 Mb scaffold corresponding to the chromosome. The chromosomal organizations (Figure 2) of the *cpe* loci correspond to a variety of arrangements of the IS1469, IS1470, *nadC*, *uapC*, and *cpe* loci (Figure 2). To our knowledge, shuffling at the

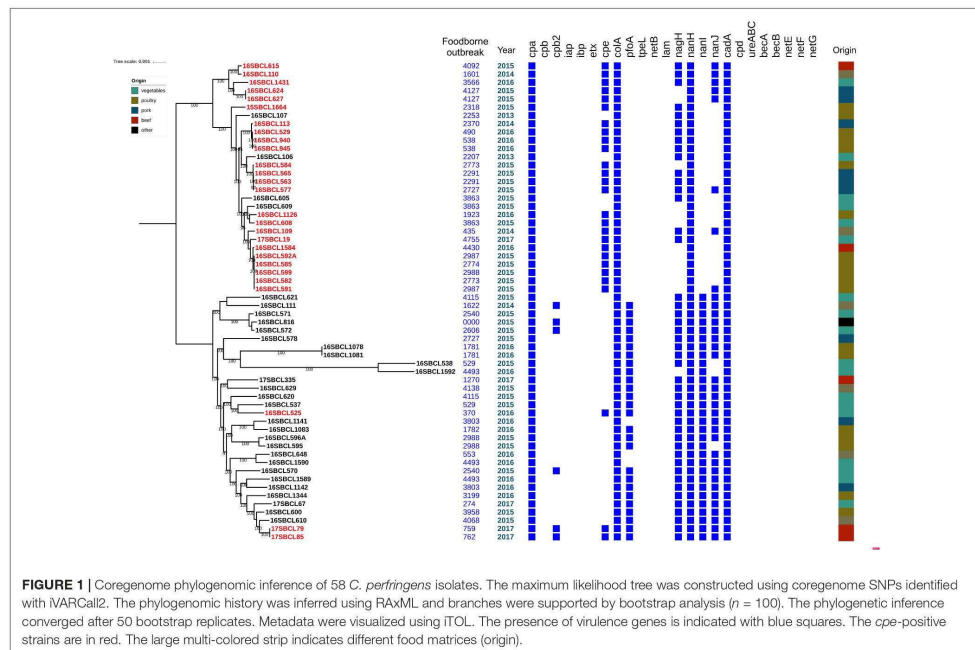
cpe locus has not previously been described and could have consequences on CPE production.

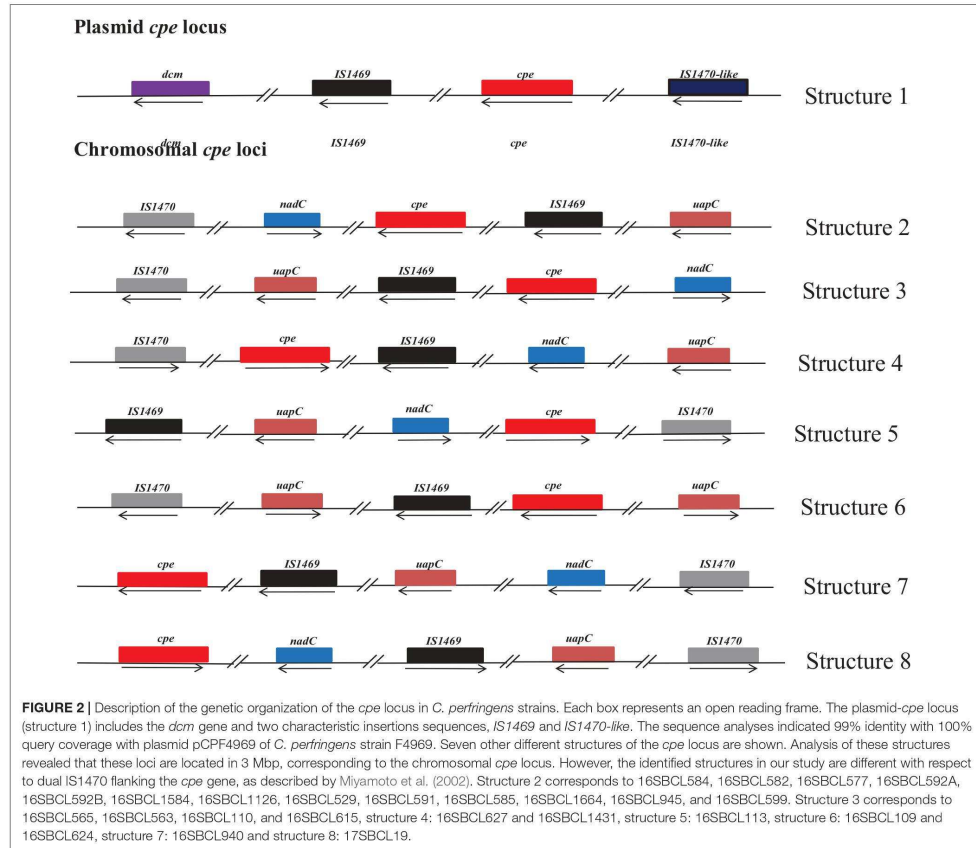
Genomic Analysis

Genomic analysis revealed unexpected links between different outbreaks. The pairwise SNP differences were used to establish the level of relatedness among the strains. A comparative analysis of intra-clade genetic diversity was performed. An average pairwise SNP difference of $8,494 \pm 499$ was calculated within chromosomal *cpe*-positive strains, compared to $21,718 \pm 901$ within *cpe*-negative and plasmid-*cpe* strains. The genetic diversities of these two clusters were significantly different in terms of pairwise SNP differences ($p < 0.05$, Figure 3).

We compared the genetic relatedness of strains isolated from the same FBOs and presenting the same profile of virulence genes. We found that the strains were indistinguishable in three out of four cases, indicating homogeneous contamination. On the other hand, two co-contaminated strains were detected with a highly unrelated pairwise distance of 6,484 SNPs (FBO2773). This result indicates that contamination with a heterogeneous profile can occur and that virulence gene profiling is not a sufficiently discriminatory criterion, in particular to differentiate strains during FBO investigations.

Nucleotide BLAST was used to identify and confirm virulence factors previously detected by real-time PCR, including the *becA*, *becB*, *cpd*, *ureABC*, *netE*, *netF* and *netG* genes. For the 58



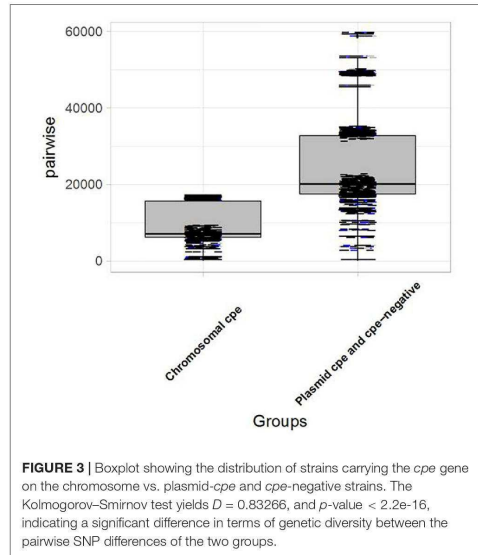


sequenced *C. perfringens* isolates, the results obtained by BLAST were similar to those obtained by real-time PCR detection. These results confirm the specificity and robustness of our PCR systems. Our *in silico* analyses were negative for *becA* and *becB* encoding BEC toxin, *ureABC* encoding ureases, *cpd* encoding lambda, and the recently identified pore-forming toxin genes *netE*, *netF* and *netG* in the 58 genomes.

DISCUSSION

C. perfringens has been recorded as the fourth most common cause of FBOs in France (Sant   Publique France, 2016). FBO caused by *C. perfringens* results from the ingestion of foods that are contaminated with spore or vegetative cells (Brynestad et al., 1997). The true human burden of *C. perfringens* is likely much higher as many outbreaks are never investigated and many

illnesses occur sporadically (Vaillant et al., 2005). Our study shows that FBOs were commonly due to meat and meat product foods (52%, 22/42), which is consistent with the epidemiology of *C. perfringens* (Wen and McClane, 2004; Grass et al., 2013). The contamination of meats may occur through contact of carcasses with feces, as well as via cross-contamination by other foods or contaminated surfaces during slaughtering. Although most *C. perfringens* FBOs are attributed to meat and poultry products (Grass et al., 2013), our study shows that in eight cases *C. perfringens* was the only pathogen isolated from vegetable dishes. This unexpected finding is likely linked to the ubiquitous nature of *C. perfringens*, which can be isolated in the environment and the soil (Uzal et al., 2014). Improper holding temperatures and incomplete cooking of foods are recognized as major factors contributing to the development of *C. perfringens* FBOs (Sarker et al., 2000a). Moreover, vegetables may initially be contaminated by spores of *C. perfringens* (Xiao et al., 2012), while the cooking



temperature of vegetable dishes is too low to destroy spores (Talukdar et al., 2016). *C. perfringens* can grow at temperatures from 20 to 53°C and spores can survive high temperatures (up to 95°C for 1 h) (McClane et al., 2013). We observed that certain virulence gene profiles (V, VII, X, see Table 4) are prevalent in our collection. It would be of interest to measure the heat resistance of a selection of isolates to determine if this phenotypic trait can explain the prevalence of specific genomic profiles in food.

Symptoms due to foodborne *C. perfringens* are similar to those caused by other foodborne pathogens, especially *B. cereus* diarrheal strains (Tewari and Abdullah, 2015). Moreover, current methods for investigation of *C. perfringens* in FBOs are based on enumeration of characteristic colonies in specific media, followed by biochemical confirmation. These methods are useful to collect strains but do not provide any typing information. As mentioned above, the revised typing scheme classifies strains producing CPE as type F. However, understanding the role and virulence of *C. perfringens* strains isolated in the context of FBOs requires us to describe the genetic diversity of the implicated strains and to develop robust and novel typing methods. In the present work, we developed a new PCR-based technique on a comprehensive set of 17 genes encoding putative virulence and toxin factors. This new PCR-based technique was used to characterize the diversity of a collection of 141 strains implicated in 42 FBOs.

The *cpa*, *colA*, *nanH*, and *cadA* genes encoding α -toxin, κ -toxin, sialidase (i.e., a small intracellular sialidase with 43 kDa of molecular weight) and deoxyribonuclease were found to be conserved in all isolates analyzed. Previous genomic studies support this result (Goossens et al., 2017; Kim et al., 2017; Kiu et al., 2017). Consequently, these genes cannot

be considered relevant markers to discriminate FBO isolates. Conversely, four genes were not identified in our collection. Consequently, our typing scheme was reduced to nine genes and was used to characterize the virulence profile of a collection of 141 *C. perfringens* strains implicated in 42 FBOs. Fifteen different profiles were recognized (Table 4), demonstrating the discriminatory power of this method. The epidemiological relationships between *C. perfringens* of different origins, including isolates from FBOs, have been investigated previously (Jost et al., 2006; Afshari et al., 2016). The previously published articles focusing on FBO isolates and animals concluded that isolates from the same outbreak have a similar pattern, while genetic diversity is high in non-outbreak isolates selected randomly (Johansson et al., 2006; Chalmers et al., 2008b; Fohler et al., 2016). Our results challenge this view and demonstrate that a range of virulence gene profiles can be found within the same FBO.

A more thorough examination of *C. perfringens* diversity revealed interesting patterns. Except for profile I, the presence of *cpe* ($p < 0.05$) was associated with a low number (5–7) of other virulence genes. More precisely, a strong association was observed between the presence of *cpe* and the lack of *pfoA* and *nanI* ($r = -0.67$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$). This observation is consistent with previous studies showing that most *cpe*-positive *C. perfringens* strains lack the *pfoA* gene (Deguchi et al., 2009). The presence of the *pfoA* and *nanI* genes was found to be significantly associated (61/66; $p < 2.2 \times 10^{-16}$). The most predominant profiles in *cpe*-negative strains were the profiles X, with 40 of the 61 strains, and VIII, with seven of the 61 strains. In these two profiles, the *pfoA* gene was associated with sialidases and/or hyaluronidase. These toxins could contribute to the overall virulence of the bacterium (Revitt-Mills et al., 2015). Previous *in vitro* studies have demonstrated a synergic effect of perfringolysin O and α -toxin on the cytotoxicity of non-foodborne strains (Awad et al., 2001); the association between *pfoA* and *nanI* could have toxicologic consequences that would be worth studying in an appropriate experimental system.

Profiles IV, V, and VII were predominant and were found in 18 of the 29 FBOs with *cpe*-positive profiles. In addition, profile VII carries *cpe* as the sole toxin-encoding gene. These results confirm that CPE is a strong contributor to foodborne illness due to *C. perfringens* (Sarker et al., 2000b).

Two to three different profiles of virulence genes were identified in three FBOs where *C. perfringens* was the only isolated pathogen, demonstrating that *Clostridium* FBOs can be associated with heterogeneous contamination of food. This important result complicates the epidemiology of clostridial FBOs, and the contribution of the different gene profiles to the development of symptoms needs to be investigated further. A direct consequence is that pathogenic strains co-infecting foods with non-pathogenic strains can be overlooked. It is therefore important to couple a PCR-based method targeting genes with the NF EN ISO 7937 standard method and characterize more than five strains isolated in the same FBO.

To further analyze the diversity of *C. perfringens*-associated FBOs, WGS of 58 isolates of *C. perfringens* was conducted to provide insight into the phylogenomic relationships and

distribution of virulence factors among *cpe*-positive and *cpe*-negative strains. To the best of our knowledge, this study represents the first large genomic analysis focusing on *C. perfringens* food isolates, compared to other studies screening other sources and including few foodborne samples (Hassan et al., 2015; Kiu et al., 2017). The computed coregenome phylogenomic inference indicates that *C. perfringens* strains carrying the *cpe* gene on the chromosome have evolved independently from *cpe*-negative and plasmid carrying *cpe* strains. This argues for the possibility of its involvement in adaptation to specific niches, and supports previous research conducted on *C. perfringens* strains from different origins showing a clear partitioning of strains capable of inducing foodborne illness into lineages distinct from those of strains isolated from other environments (Hibberd et al., 2011). Previous studies (Miyamoto et al., 2002; Li et al., 2013) have localized the *cpe* gene near the *dcm* gene on both the pCPF4969 and pCPF5603 plasmids of type A isolates. Our investigation of the genetic environment of 16SBCL525, 17SBCL79, and 17SBCL85 is consistent with these previous studies and demonstrates that the *dcm* gene is proximal to the plasmid-borne *cpe* gene. The fact that these strains were phylogenetically clustered with *cpe*-negative strains supports the notion that the *dcm* region of plasmids represents a hot-spot for insertion of certain mobile genetic elements, including some carrying a *cpe* gene. An early study indicated that *C. perfringens* carrying the *cpe* gene on the chromosome is flanked by upstream and downstream *IS1470* and, instead of a *dcm* gene, they carry the purine permease (*uapC*) and quinolinate phosphoribosyltransferase (*nadC*) genes on the chromosome (Bryn  stad et al., 1997). Our investigations support this assertion and, to our knowledge, this is the first study describing a diversity of genetic arrangements of the *cpe* locus in chromosomal *cpe* strains (Bryn  stad et al., 1997; Miyamoto et al., 2002; Li et al., 2010).

The coregenome phylogenomic reconstructions provide interesting epidemiologic information and indicate actual relationships between strains from different outbreaks. FBOs 2987, 2774, 2988, and 2773 were caused by closely related strains with regard to a limited average of pairwise distances between them (i.e., 7.0 SNPs) and common profiles of virulence genes. This similarity could be due to the same biotype that may reach food and cause FBOs. Due to wide biotype and ecological niches, genetically diverse strains of *C. perfringens* may be found in food matrices. Important epidemiologic findings have resulted from the high resolution of genome sequencing. For instance, WGS was used to demonstrate that many *C. difficile* cases could not be attributed to transmission from asymptomatic patients, but that there is high diversity of *C. difficile* in the environment (Tang et al., 2017). This approach could be used in our analysis. We have identified considerable genetic diversity within *cpe*-negative strains. The high genetic diversity may in part be explained by the broad distribution of this group in the environment. An earlier genomic comparison study conducted on three genomes of *C. perfringens* (ATCC13124, SM101, and strain 13) revealed considerable genomic diversity with more than 300 unique genomic islands

identified (Myers et al., 2006). Our phylogenomic analysis supports this notion with regard to strains 16SBCL582 and 16SBCL584 from FBO 2273. However, a comparison of the virulence gene profiles of these distant strains (obtained by real-time PCR) indicates that they present the same virulence gene profile. This result suggests that the approaches based on the detection of virulence factors are not sufficient to efficiently discriminate *C. perfringens* strains.

Another interesting finding is that strains are grouped according to the distribution of virulence factors. In particular, the presence of the *nanI*, *pfoA* and *nagH* genes in *cpe*-negative strains is of interest, and it would be worthwhile to investigate the putative role of these virulence factors in *cpe*-negative disease.

CONCLUSION

The aim of our study was to characterize *C. perfringens* involved in FBOs from the Paris region between 2013 and 2017 by investigating profiles of virulence genes according to the presence or absence of 17 genes encoding 15 virulence factors screened by a new real-time PCR tool. High diversity was obtained between strains in different outbreaks. Heterogeneous profiles of virulence genes within the same outbreaks were highlighted for the first time, indicating that food may be contaminated with different *C. perfringens* strains that may or may not harbor the *cpe* gene. Our study emphasizes the importance of more detailed characterization of *C. perfringens* isolates involved in FBOs than simple enumeration on specific agar, as suggested by the EN ISO 7937 reference method and/or characterization of five random isolates.

We have shown that the reconstructed coregenome phylogenomic history of *C. perfringens* food isolates can identify two main groups, both being able to contaminate food. Our research did not clearly associate food sources with a specific clade. However, future comparative genomic studies on strains of various origins and from different geographical areas should provide clues to understand *C. perfringens* pathogenicity and associations to ecological niches. Genomic studies combined with epidemiological data provide new leads to design toxicity assays that may renew our understanding of the molecular basis of *C. perfringens* pathogenicity, and ultimately identify new biomarkers to differentiate between pathogenic and non-pathogenic *C. perfringens* strains. Finally, it would be interesting to characterize *C. perfringens* strains implicated in the FBO with respect to their reservoir.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AMA conceived the study, designed the experiments, and wrote the manuscript. NR approved bioinformatics analyses, provided advice for statistical analyses, and revised the manuscript. AMA and KH performed all bioinformatics analyses. MLN contributed to the microbiologic analyses. SaD, PF, and SoD conceived the methodology and performed high throughput

real-time PCR analyses. OF, J-AH, and M-YM conceived and piloted the project and revised and approved the manuscript for publication.

FUNDING

This study was supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES). AMA is the recipient of a doctoral scholarship funded by the Islamic Development Bank (IsDB). This article is also part of the European Joint Programme One Health EJP. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No. 773830.

REFERENCES

- Adams, V., Han, X., Lyras, D., and Rood, J. I. (2018). Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid* 99, 32–39. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.07.002
- Adams, V., Li, J., Wisniewski, J. A., Uzal, F. A., Moore, R. J., McClane, B. A., et al. (2015). "Virulence plasmids of spore-forming bacteria" in *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, eds M. Tolmasey and J. Carlos (Washington, D.C: ASM Press), 533–557.
- Afshari, A., Jamshidi, A., Razmyar, J., and Rad, M. (2016). Genomic diversity of *Clostridium perfringens* strains isolated from food and human sources. *Iran. J. Vet. Res.* 17, 160–164.
- Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschläger, N., Frey, J., Miserez, R., et al. (2008). Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Vet. Microbiol.* 127, 179–185. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.024
- Anonymous (2005). NF EN ISO 7937, food microbiology-horizontal method for enumeration of *C. perfringens*. *AFNOR V08–019*, 17.
- Awad, M. M., Ellemor, D. M., Boyd, R. L., Emmings, J. J., and Rood, J. I. (2001). Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Infect. Immun.* 69, 7904–7910. doi: 10.1128/IAI.69.12.7904-7910.2001
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M. F., Lió, P., et al. (2015). McDuSa: a multi-draft based scaffold. *Bioinformatics* 31, 2443–2451. doi: 10.1093/bioinformatics/btv171
- Brynstad, S., and Granum, P. E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 195–202. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00680-8
- Brynstad, S., Synstad, B., and Granum, P. E. (1997). The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology* 143, 2109–2115. doi: 10.1099/00221287-143-7-2109
- Bushnell, B. (2014). *BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner*. Available at: <https://escholarship.org/uc/item/1h3515gn> (accessed May 11, 2018).
- Chalmers, G., Bruce, H. L., Hunter, D. B., Parreira, V. R., Kulkarni, R. R., Jiang, Y. F., et al. (2008a). Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3957–3964. doi: 10.1128/JCM.01548-08 (accessed May 11, 2018).
- Chalmers, G., Martin, S. W., Prescott, J. F., and Boerlin, P. (2008b). Typing of *Clostridium perfringens* by multiple-locus variable number of tandem repeats analysis. *Vet. Microbiol.* 128, 126–135. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.09.018
- Chon, J.-W., Park, J.-S., Hyeon, J.-Y., Park, C., Song, K.-Y., Hong, K.-W., et al. (2012). Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 530–534. doi: 10.4014/jmb.1107.07064

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the LCSV (*Laboratoire Central des Services Vétérinaires*) for strain collection, the GAMeR team, and Deborah Merda for advice on bioinformatics analyses. We also like to thank Dr. Hélène Bergis for providing us with positive control strains for PCR, Pierre-Emmanuel Douarre for his valuable advice, and Craig Stevens, MA, ELS for English editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00777/full#supplementary-material>

- Cock, P. J., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., et al. (2009). Biopython: freely available python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25, 1422–1423. doi: 10.1093/bioinformatics/btp163
- Deguchi, A., Miyamoto, K., Kuwahara, T., Miki, Y., Kaneko, I., Li, J., et al. (2009). Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One* 4:e5598. doi: 10.1371/journal.pone.0005598
- EFSA (2016). Scientific report of european food safety authority. Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks. *EFSA J.* 14, 4634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
- Felten, A., Vila Nova, M., Durimel, K., Guillier, L., Mistou, M. Y., and Radomski, N. (2017). First gene-ontology enrichment analysis based on bacterial coregenome variants: insights into adaptations of *Salmonella* serovars to mammalian- and avian-hosts. *BMC Microbiol.* 17:222. doi: 10.1186/s12866-017-1132-1
- Fohler, S., Klein, G., Hoedemaker, M., Scheu, T., Seyboldt, C., Campe, A., et al. (2016). Diversity of *Clostridium perfringens* toxin-genotypes from dairy farms. *BMC Microbiol.* 16:199. doi: 10.1186/s12866-016-0812-6
- Freedman, J. C., Shrestha, A., and McClane, B. A. (2016). *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational applications. *Toxins* 8:E73. doi: 10.3390/toxins8030073
- Gao, Z., and McClane, B. A. (2012). Use of *Clostridium perfringens* enterotoxin and the enterotoxin receptor-binding domain (C-CPE) for cancer treatment: opportunities and challenges. *J. Toxicol.* 2012:981626. doi: 10.1155/2012/981626
- Goossens, E., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P. R., et al. (2017). Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Vet. Res.* 48:9. doi: 10.1186/s13567-017-0413-x
- Grass, J. E., Gould, L. H., and Mahon, B. E. (2013). Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 131–136. doi: 10.1089/fpd.2012.1316
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086
- Hassan, K. A., Elbourne, L. D. H., Tetu, S. G., Melville, S. B., Rood, J. I., and Paulsen, I. T. (2015). Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes. *Res. Microbiol.* 166, 255–263. doi: 10.1016/j.resmic.2014.10.003
- Hibberd, M. C., Neumann, A. P., Rehberger, T. G., and Siragusa, G. R. (2011). Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1556–1567. doi: 10.1128/JCM.01884-10
- Johansson, A., Aspan, A., Bagge, E., Båverud, V., Engström, B. E., and Johansson, K. E. (2006). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.* 6:47. doi: 10.1186/1471-2180-6-47
- Jost, B. H., Trinh, H. T., and Songer, J. G. (2006). Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Vet. Microbiol.* 116, 158–165. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.03.025

- Keyburn, A. L., Boyce, J. D., Vaz, P., Bannam, T. L., Ford, M. E., Parker, D., et al. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4:e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0040026
- Kim, Y. B., Kim, J. Y., Song, H. S., Lee, C., Kwon, J., Kang, J., et al. (2017). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens* CBA7123 isolated from a faecal sample from Korea. *Gut Pathog.* 9:32. doi: 10.1186/s13099-017-0181-1
- Kiu, R., Caim, S., Alexander, S., Pachori, P., and Hall, L. J. (2017). Probing genomic aspects of the multi-host pathogen *Clostridium perfringens* reveals significant pangenome diversity, and a diverse array of virulence factors. *Front. Microbiol.* 8:2485. doi: 10.3389/fmicb.2017.02485
- Kiu, R., and Hall, L. J. (2018). An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg. Microbes Infect.* 7:141. doi: 10.1038/s41426-018-0144-8
- Kosugi, S., Hirakawa, H., and Tabata, S. (2015). GMDCloser: closing gaps in assemblies accurately with a likelihood-based selection of contig or long-read alignments. *Bioinformatics* 31, 3733–3741. doi: 10.1093/bioinformatics/btv465
- Lacey, J. A., Allnutt, T. R., Vezina, B., Van, T. T. H., Stent, T., Han, X., et al. (2018). Whole genome analysis reveals the diversity and evolutionary relationships between necrotic enteritis-causing strains of *Clostridium perfringens*. *BMC Genom.* 19:379. doi: 10.1186/s12864-018-4771-1
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., and Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.* 5:770. doi: 10.3389/fmicb.2014.00770
- Letunic, I., and Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245. doi: 10.1093/nar/gkw290
- Li, J., Adams, V., Bannam, T. L., Miyamoto, K., Garcia, J. P., Uzal, F. A., et al. (2013). Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 208–233. doi: 10.1128/MMBR.00062-12
- Li, J., Miyamoto, K., Sayeed, S., and McClane, B. A. (2010). Organization of the cpe locus in CPE-Positive *Clostridium perfringens* Type C and D isolates. *PLoS One* 5:e10932. doi: 10.1371/journal.pone.0010932
- Li, J., Paredes-Sabja, D., Sarker, M. R., and McClane, B. A. (2016). *Clostridium perfringens* sporulation and sporulation-associated toxin production. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–27. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015
- Lin, Y.-T., and Labbe, R. (2003). Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1642–1646. doi: 10.1128/AEM.69.3.1642-1646.2003
- Lindström, M., Heikinheimo, A., Lahti, P., and Korkeala, H. (2011). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol.* 28, 192–198. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.020
- Lukinmaa, S., Takkunen, E., and Siitonen, A. (2002). Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* related to food-borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3744–3749. doi: 10.1128/AEM.68.8.3744-3749.2002
- McClane, B. A., Robertson, S. L., and Li, J. (2013). “*Clostridium perfringens*,” in *Food Microbiology*, eds M. Doyle and R. Buchanan (Washington, DC: ASM Press), 465–489. doi: 10.1128/9781555818463.ch18
- Mehdizadeh Gohari, I., Kropinski, A. M., Weese, S. J., Whitehead, A. E., Parreira, V. R., Boerlin, P., et al. (2017). NetF-producing *Clostridium perfringens*: clonality and plasmid pathogenicity loci analysis. *Infect. Genet. Evol.* 49, 32–38. doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.028
- Mehdizadeh Gohari, I., Parreira, V. R., Nowell, V. J., Nicholson, V. M., Oliphant, K., and Prescott, J. F. (2015). A Novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One* 10:e0122684. doi: 10.1371/journal.pone.0122684
- Miyamoto, K., Chakrabarti, G., Morino, Y., and McClane, B. A. (2002). Organization of the plasmid cpe Locus in *Clostridium perfringens* type A isolates. *Infect. Immun.* 70, 4261–4272. doi: 10.1128/IAI.70.8.4261-4272.2002
- Myers, G. S. A., Rasko, D. A., Cheung, J. K., Ravel, J., Seshadri, R., DeBoy, R. T., et al. (2006). Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res.* 16, 1031–1040. doi: 10.1101/gr.5238106
- Myers, L., and Sirois, M. J. (2004). Spearman correlation coefficients, differences between. *Encycl. Stat. Sci.* 2, 1–11. doi: 10.1002/0471667196.ess5050.pub2
- Obana, N., and Nakamura, K. (2011). A novel toxin regulator, the CPE1446-CPE1447 protein heteromeric complex, controls toxin genes in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 193, 4417–4424. doi: 10.1128/JB.00262-11
- Ondov, B. D., Treangen, T. J., Melsted, P., Mallonee, A. B., Bergman, N. H., Koren, S., et al. (2016). Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol.* 17:132. doi: 10.1186/s13059-016-0997-x
- Pattengale, N. D., Alipour, M., Bininda-Emonds, O. R., Moret, B. M., and Stamatakis, A. (2010). How many bootstrap replicates are necessary. *J. Comput. Biol.* 17, 337–354. doi: 10.1089/cmb.2009.0179
- Revitt-Mills, S. A., Rood, J. L., and Adams, V. (2015). *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiol. Aust.* 36, 114–117. doi: 10.1071/MA15039
- Rey, D., and Neuhauser, M. (2011). *Wilcoxon-Signed-Rank Test*, in: *International Encyclopedia of Statistical Science*. Berlin: Springer, 1658–1659. doi: 10.1007/978-3-642-04898-2_61
- Rood, J. L., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B. A., Melville, S. B., et al. (2018). Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53, 5–10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011
- Sandmann, S., De Graaf, A. O., Karimi, M., Van Der Reijden, B. A., Hellström-Lindberg, E., Jansen, J. H., et al. (2017). Evaluating variant calling tools for non-matched next-generation sequencing data. *Sci. Rep.* 7:43169. doi: 10.1038/srep43169
- Santé Publique France (2016). *Surveillance des Toxi-Infections Alimentaires Collectives. Données de la Déclaration Obligatoire*. Saint-Maurice: Santé Publique France, 11.
- Sarker, M. R., Carman, R. J., and McClane, B. A. (2000a). Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol. Microbiol.* 35, 249–249. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01534.x
- Sarker, M. R., Shivers, R. P., Sparks, S. G., Juneja, V. K., and McClane, B. A. (2000b). Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3234–3240. doi: 10.1128/AEM.66.8.3234-3240.2000
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., et al. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15. doi: 10.3201/eid1701.P11101
- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., et al. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 996–1001. doi: 10.1073/pnas.022493799
- Stamatakis, A. (2015). Using RAxML to infer phylogenies. *Curr. Protoc. Bioinform.* 51, 6.14.1–6.14.14. doi: 10.1002/0471250953.bi061451
- Talukdar, P. K., Udumipijitkul, P., Hossain, A., and Sarker, M. R. (2016). Inactivation strategies for *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02731-16. doi: 10.1128/AEM.02731-16
- Tang, P., Croxen, M. A., Hasan, M. R., Hsiao, W. W. L., and Hoang, L. M. (2017). Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am. J. Infect. Control* 45, 170–179. doi: 10.1016/j.ajic.2016.05.015
- Tewari, A., and Abdullah, S. (2015). *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *J. Food Sci. Technol.* 52, 2500–2511. doi: 10.1007/s13197-014-1344-4
- Uzal, F. A., Freedman, J. C., Shrestha, A., Theoret, J. R., Garcia, J., Awad, M. M., et al. (2014). Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 9, 361–377. doi: 10.2217/fmb.13.168
- Uzal, F. A., McClane, B. A., Cheung, J. K., Theoret, J., Garcia, J. P., Moore, R. J., et al. (2015). Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. *Vet. Microbiol.* 179, 23–33. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.013
- Vaillant, V., Valk, H. D., Baron, E., Ancelle, T., Colin, P., Delmas, M. C., et al. (2005). Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 221–232. doi: 10.1089/fpd.2005.2.221
- Veshnyakova, A., Piontek, J., Protze, J., Waziri, N., Heise, I., and Krause, G. (2012). Mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin interaction with claudin-3/4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J. Biol. Chem.* 287, 1698–1708. doi: 10.1074/jbc.M111.312165

- Wen, Q., and McClane, B. A. (2004). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2685–2691. doi: 10.1128/AEM.70.5.2685-2691.2004
- Xiao, Y. (2014). *Clostridium perfringens* Sporulation, Germination and Outgrowth in Food: A functional Genomics Approach. Ph. D. Thesis. Wageningen: Wageningen University.
- Xiao, Y., Wagendorp, A., Moezelaar, R., Abec, T., and Wells-Bennik, M. H. (2012). A wide variety of *Clostridium perfringens* type A food-borne isolates that carry a chromosomal cpe gene belong to one multilocus sequence typing cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7060–7068. doi: 10.1128/AEM.01486-12
- Xu, S., Ackerman, M. S., Long, H., Bright, L., Spitze, K., Ramsdell, J. S., et al. (2015). A male-specific genetic map of the Microcrustacean *Daphnia pulex* based on single-sperm whole-genome sequencing. *Genetics* 201, 31–38. doi: 10.1534/genetics.115.179028
- Yasugi, M., Sugahara, Y., Hoshi, H., Kondo, K., Talukdar, P. K., Sarker, M. R., et al. (2015). In vitro cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* isolate carrying a chromosomal cpe gene is exclusively dependent on sporulation and enterotoxin production. *Microb. Pathog.* 85, 1–10. doi: 10.1016/j.micpath.2015.04.003
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2019 Mahamat Abdelrahim, Radomski, Delannoy, Djellal, Le Négrate, Hadjab, Fach, Hennekinne, Mistou and Firmesse. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.4. Conclusion et perspectives

En conclusion, ces travaux ont permis le développement d'une méthode rapide et fiable permettant la détection de 17 gènes codant les facteurs de virulence. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois la présence de profils de gènes de virulence hétérogènes de souches isolées au cours d'une même TIAC, indiquant l'importance de coupler la méthode de la norme EN NF ISO 7937 à une autre méthode de caractérisation plus discriminante. L'inférence phylogénomique du core-génome a montré l'existence de deux clades génétiquement distincts. Le premier clade est essentiellement composé des souches *cpe+* chromosomique proches les uns des autres et le deuxième clade est composé de souches *cpe+* plasmidiques et de souches *cpe-* très diversifiées. Il serait donc intéressant de confirmer cette variation intra et inter clade par la recherche des éléments génétiques mobiles qui peuvent jouer un rôle important dans la relation phylogénétique et constituer une source importante de facteurs de virulence.

CHAPITRE 2. EXTENSION DE LA COLLECTION ET CARACTERISATION GENOMIQUE DES ELEMENTS GENETIQUE MOBILES

2.1. Contexte et objectifs

Comme évoqué précédemment, *C. perfringens* est une bactérie ubiquitaire, présente partout dans l'environnement comme le sol et dans le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux (Uzal et al., 2014). Cette capacité à se développer dans de multiples niches environnementales y compris le tractus digestif des espèces hôtes, permet une interaction avec diverses communautés microbiennes y compris les virus (Kiu et al., 2017). L'adaptation de *C. perfringens* à ces différents environnements peut se faire par le biais de transferts horizontaux d'éléments génétiques mobiles ou « mobilome » comme les plasmides, les transposons conjugatifs ou les îlots génomiques pouvant porter des gènes de résistance aux antimicrobiens ou codant pour des toxines et les phages (Adams et al., 2015; Bannam et al., 2006; Kiu and Hall, 2018). La majorité des gènes codant les facteurs de virulence de *C. perfringens* est localisé sur des plasmides, on y trouve cinq des six gènes utilisés dans la classification (Revitt-Mills et al., 2015). Ces plasmides sont susceptibles d'être transférés horizontalement d'une souche à une autre (Li et al., 2013). Le transfert des plasmides conjugatifs (codant des fonctions permettant leur propre transfert) entre les souches de *C. perfringens* a été démontré *in vitro*. A titre d'exemple, il a été démontré la conversion d'une souche de type A en type D par le transfert du plasmide pCP8533 portant le gène *etx* (Han et al., 2015; Li et al., 2013). En plus des gènes codant les toxines, le transfert des plasmides conjugatifs est à l'origine de la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques (Adams et al., 2018). L'analyse de séquences d'une souche de *C. perfringens* de type G a permis d'identifier deux plasmides, pJIR3537 et pCW3-like, appartenant à la famille pCW3 (Bannam et al., 2006). Ce dernier a été identifié comme étant un plasmide conjugatif portant un gène de résistance à la tétracycline (Wisniewski et al., 2015). L'analyse des plasmides est donc importante pour évaluer le potentiel de transfert de gène lié à *C. perfringens*.

D'autres éléments génétiques mobiles comme les phages peuvent être également une source importante de transfert des gènes de virulence ou de résistance aux antimicrobiens

(Kim et al., 2012 ; Lacey et al., 2018). A titre d'exemple, il a été rapporté que les phages phi3626 et phi8533 favorisent l'entrée en sporulation et augmentent la résistance à la chaleur de *C. perfringens* (Kim et al., 2012; Zimmer et al., 2002).

L'accès aux données de séquençage a grandement contribué à la détection des éléments génétiques mobiles permettant d'appréhender la diversité génomique et d'améliorer la caractérisation de *C. perfringens*. Ainsi, il a été constaté la présence des phages phiSM101 et phi3626 suite au séquençage du génome de la souche SM101 isolée d'un cas de toxi-infection alimentaire et de souches isolées de patients atteints de myonécrose (Myers et al., 2006). Récemment, une analyse du pan-génome d'une collection de 56 souches de *C. perfringens* provenant d'animaux, d'humains et d'aliments a permis d'établir que la grande variabilité observée était vraisemblablement induite par des événements de transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (Kiu et al., 2017).

D'autre part, les phages peuvent provoquer la lyse des cellules bactériennes ; face à cette menace, les bactéries ont développé un système pour détecter et dégrader l'ADN phagique : les régions CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) permettent de cibler spécifiquement de petites séquences d'ADN phagiques (Deveau et al., 2010). Les régions CRISPR sont également connues chez d'autres bactéries comme *Escherichia coli* où elles sont également utilisées comme cible pour le typage des souches (Delannoy et al., 2012). Des études ont néanmoins révélé une faible présence (30 %) de loci CRISPR dans une collection de 56 souches de *C. perfringens* (Kiu et al., 2017; Lacey et al., 2018).

L'analyse phylogénomique basée sur l'étude du core-génome du panel de 58 souches issues des TIAC a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des souches isolées à partir d'une même TIAC qui peuvent même montrer des profils de virulence différents (Abdelrahim et al., 2019). Elle a permis de définir également deux clades correspondant d'une part aux souches aux souches *cpe+* chromosomique et d'autre part aux souches *cpe-* ou *cpe+* plasmidique. De même, il a été identifié des souches très proches, au regard de leur nombre de SNP, impliquées dans des épisodes toxiques différents. Cette importante information épidémiologique ainsi que la diversité observée nous ont conduits à étendre l'étude phylogénomique à l'ensemble des 146 souches de la collection. En outre, nous avons

approfondi l'analyse génomique en exploitant le pan-génome qui est un réservoir important de la diversité génétique de l'espèce. Un des objectifs étant d'identifier au sein du génome accessoire la présence éventuelle de gènes qui seraient spécifiques à chacun des deux clades précédemment identifiés.

Le présent travail poursuit donc la caractérisation génomique à grande échelle des souches de *C. perfringens*. Pour cela, les relations phylogénomiques des 146 souches isolées ont été inférées à partir de leur core-génome. Ensuite, une recherche *in silico* (BLAST) des gènes codant les facteurs de virulence a été réalisée. Enfin, une construction du pan-génome a été effectuée afin d'extraire et caractériser le génome accessoire. Ce dernier a été utilisé pour identifier des marqueurs spécifiques aux souches *cpe+* et aux souches *cpe-*.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Notre collection est constituée de 146 souches de *C. perfringens* impliquées dans 44 TIAC survenues en région parisienne entre 2013 et 2018. La **figure 14** donne une répartition des origines alimentaires des souches impliquées dans les TIAC en région parisienne. Une description détaillée de la collection est donnée dans l'annexe 1.

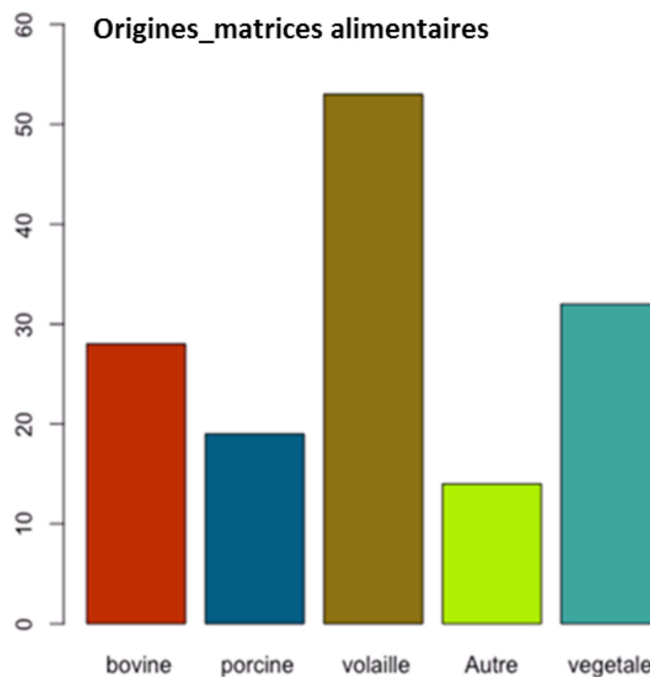


Figure 14. Histogramme montrant le nombre de souches par origine alimentaire

Les aliments suspectés à l'origine des TIAC ont été analysés par le Laboratoire Central des Services Vétérinaires (LSCV) de Maisons-Alfort pour la recherche et le dénombrement des germes responsables des TIAC (analyses microbiologiques de première intention). Le dénombrement de *C. perfringens* est réalisé selon la norme EN NF ISO 7937. Comme décrit précédemment, selon cette norme, le dénombrement se fait en milieu gélosé tryptose-sulfite supplémenté en cyclosérine (TSC, BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) en condition d'anaérobiose à 37°C. La confirmation de la présence de *C. perfringens* est réalisée en bouillon lactose sulfite à 46°C dans lequel entre une et cinq colonies isolées sur milieu gélosé TSC sont confirmées. Les colonies confirmées sont ensuite repiquées et isolées sur une gélose Columbia

+ 5% de sang de mouton (COS, BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Une mise en conservation de chaque colonie est effectuée en cryobilles à -20 °C.

2.2.2. Extraction d'ADN pour le séquençage du génome complet

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée en utilisant le kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), selon les recommandations du fabricant (annexe 2). Le kit est basé sur un protocole en quatre étapes : *i*) lyse enzymatique des cellules, *ii*) hydrolyse des ARN par une RNase, *iii*) précipitations au sel des protéines cellulaires et *iv*) l'ADN génomique est concentré et dessalé par précipitation à l'isopropanol.

La concentration et la pureté des solutions d'ADN extraits ont été évaluées par les mesures d'absorbance à 230, 260 et 280 nm au NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), correspondant respectivement à la mesure de la concentration en composés organiques (A_{260}/A_{280}) et en protéines (A_{260}/A_{230}) de chaque échantillon. L'ADN est considéré comme pure avec un ratio A_{260}/A_{280} proche de $1,8 \pm 0,1$ et un ratio A_{260}/A_{230} compris entre 1,8 et 2,2. Un ratio inférieur à 1.8 indique que l'échantillon est contaminé avec des protéines ou un solvant organique comme le phénol. Ces rapports permettent de détecter les éventuelles contaminations et ainsi de s'assurer de la bonne qualité des ADN extraits.

Afin de s'assurer de l'intégrité de l'ADN et de l'absence de contamination par l'ARN, 200 ng des solutions d'ADN extraites sont déposés sur gel d'agarose 0,8% à haute résolution (SeaKem, Lonza, Bâle, Suisse). La présence d'une bande correspondant à la migration de l'ADN génomique est vérifiée sous UV pour chaque solution d'ADN extraites en utilisant le système Gel Doc (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

2.2.3. Séquençage, assemblage et annotation

Le séquençage du génome complet a été réalisé par l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (www.icm-institute.org, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris) qui s'est chargé de la fabrication des librairies (nextEra XT, Illumina, San Diego, USA) à partir de nos solutions d'ADN extraites et du séquençage en utilisant la technologie Nextseq 2x150 paires de bases (pb) (Illumina, San Diego, USA).

L'assemblage, l'annotation et la recherche des variants ont été réalisés à l'aide d'ARTwork (Kevin et al., 2017), un « *workflow* » automatisé de traitement de *reads* multipathogènes développé au laboratoire par la mission « *Genome Analysis Modelisation and Risk* » (GAMeR). ARTwork est une succession de programmes dont le principe consiste tout d'abord à décompresser les *reads*-pairets stockés sous format fastq.gz et à les normaliser à 100X. La couverture des *reads* sur le génome de référence est ensuite réalisée en utilisant l'outil BBMap (Bushnell, 2014). Le génome de référence partageant le plus de similarité avec l'assemblage a été choisi dans les bases de données parmi une collection de génomes proches par estimation de l'indice de Jaccard (Ondov et al., 2016) qui consiste à comparer les séquences sans les avoir alignées.

En vue de produire un assemblage de bonne qualité, ARTwork utilise l'application Trimmomatic (Bolger et al., 2014) pour supprimer les portions de *reads* présentant un *phred score* inférieur à 20 et les *reads* de taille inférieure à 50 pb. Enfin, le génome de référence est utilisé pour réaliser le *scaffolding* en utilisant l'application MeDuSa v. 1.3 (Bosi et al., 2015) et la fermeture des gaps en utilisant GMCloser. La qualité des assemblages a été évaluée en utilisant l'outil QUAST (Gurevich et al., 2013).

Une fois l'assemblage réalisé et évalué, les génomes sont annotés en utilisant l'application Prokka v. 1.11 (Seemann, 2014) dont le principe consiste à interroger plusieurs bases de données et outils de prédiction de gènes et de retrouver dans l'assemblage les coordonnées et la signification des traits telles que les séquences codantes (CDS), les ARNs (ribosomal, de transfert) et les peptides de signalisation. Les fichiers d'annotations « genbank » (gbk) et « genome feature file » (gff) constituent les sorties finales de Prokka. La **figure 15** montre les différentes étapes de traitements implémentés par ARTWork (Kevin et al., 2017).

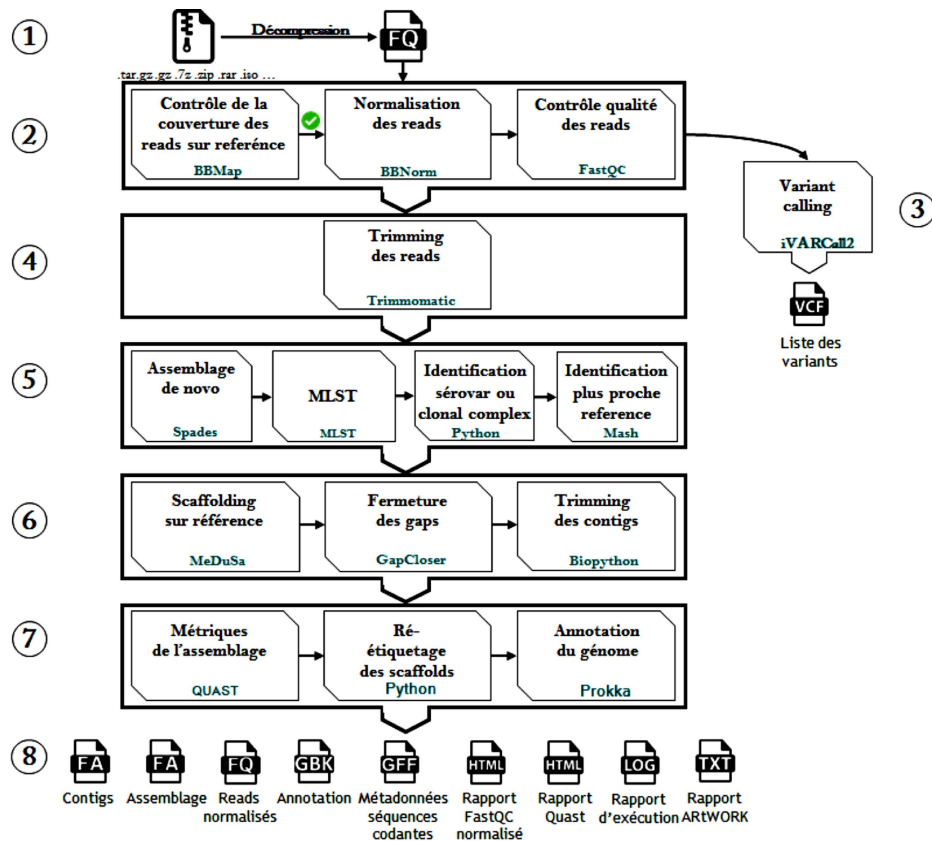


Figure 15. Vue simplifiée des étapes de traitement implémentées dans le pipeline ARTWork

2.2.4. Recherche de variants « Variant calling »

La recherche et l'identification de variants ont été effectuées par *mapping* des *reads* d'une souche sur le génome de référence en utilisant le *workflow* iVARCall2 (Felten et al., 2017). Ce *workflow* gère simultanément les SNP et les petites insertions délétions (inDels) (de moins de 50 bases) au niveau du core-génome pour chaque génome indépendamment du génome de référence. Le *workflow* iVARCall2 génère des fichiers g.VCF (*genomic variant call format*) pour chaque génome qui peuvent être filtrés et fusionnés afin de produire des variants de haute qualité et des pseudogénomes apparentés. Ce pseudogénome correspond au génome de référence où les génotypes des variants détectées sont remplacés dans chaque génome du jeu de données. A la fin du *workflow* iVARCall2, des rapports sur les couvertures en largeur (*breadth coverage*) et en profondeur (*deep coverage*) sont produits, ainsi que des matrices de distances par paires (*pairwise distance*).

2.2.5. Inférence phylogénomique core-génome

La reconstruction des arbres phylogénomiques a été réalisée avec RAxML v.8.2.4 (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) sur la base des variants du core-génome détectés par iVarCall2 en utilisant la méthode de maximum vraisemblance (Yang, 2007). 1000 bootstraps ont été effectués. Il y a convergence de ceux-ci après 50 bootstraps. L'interface web iTOL a été utilisée pour visualiser les arbres phylogénomiques (Letunic et Bork, 2016).

2.2.6. Construction du pan-génome

Les génomes annotés de 146 souches au format gff (produits par Prokka) ont ensuite été utilisés pour identifier et calculer le nombre total de gènes (le pan-génome), de gènes core (conservés) et de gènes accessoires (McInerney et al., 2017) à l'aide du *pipeline* pan-génomique roary v.3.8 (Page et al., 2015). Le principe de roary consiste à extraire à partir des fichiers d'annotations gff, les séquences codantes (CDS) pour les convertir en séquences protéiques. Les séquences protéiques sont ensuite filtrées pour éliminer les séquences partielles inférieures à 120 nucléotides ou dépourvues de cadres ouverts de lecture (ORF). Roary produit une matrice de présence/absence des gènes du pan-génome, un fichier multi-fasta des gènes du core-génome et une phylogénie basée sur la présence ou l'absence des gènes accessoires. Un script R (Racine, 2012) a été utilisé pour générer des statistiques sur la variation du pan-génome au fur et à mesure que des génomes sont ajoutés (de façon aléatoire).

2.2.7. Annotation fonctionnelle

Afin de prédire les fonctionnalités du pan-génome, une recherche par BLAST a été effectuée à partir des séquences protéiques des gènes. Les gènes du core-génome, du génome accessoire et les gènes uniques ont été extraits en utilisant l'outil Samtools v. 1.2 (Li et al., 2009). La base de données COG (Cluster of Orthologous Groups, (Tatusov et al., 2003)) a été utilisée pour affecter une catégorie fonctionnelle à chaque protéine codée par les gènes identifiés. La nomenclature COG définit 25 catégories regroupées en 4 grandes familles de fonctions (traitement et stockage de l'information, métabolisme, signalisation et processus cellulaires ou mauvaise caractérisation) qui sont eux même réparties dans 21 catégories

fonctionnelles (**Tableau 6**). Le programme eggNOG-mapper (Huerta-Cepas et al., 2017) a été utilisé pour assigner les catégories fonctionnelles aux COG détectés.

Tableau 6. catégorie fonctionnelle des COG (Tatusov et al., 2003)

Catégorie fonctionnelle générale	Catégorie fonctionnelle spécifique
Métabolisme	(C) Production et conversion de l'énergie
	(E) Transport et métabolisme des acides aminés
	(F) Transport et métabolisme des nucléotides
	(G) Transport et métabolisme des glucides
	(H) Transport et métabolisme des coenzymes
	(I) Transport et métabolisme des lipides
	(P) Transport et métabolisme d'ions inorganiques
	(Q) Catabolisme, biogenèse et transport de métabolites secondaires
Signalisation et processus cellulaires	(D) Contrôle du cycle cellulaire, division cellulaire et séparation des chromosomes
	(M) Biogenèse de la paroi, des membranes et de l'enveloppe
	(N) Mobilité cellulaire
	(O) Modifications post-traductionnelles, renouvellement des protéines et protéines chaperonnes
	(T) Mécanismes de transduction des signaux
	(U) Trafic intracellulaire, sécrétion et transport vésiculaire
	(V) Mécanismes de défense et virulence
	(W) Structures extracellulaires
Traitement et stockage de l'information	(J) Traduction, structure et biogenèse des ribosomes
	(K) Transcription
	(L) Réplication, recombinaison et réparation
	(R) Fonction générale prédite uniquement
Mauvaise caractérisation	(S) Fonction inconnue

2.2.8. Détection *in silico* des éléments génétiques mobiles

2.2.8.1. Détection des phages

La recherche des phages a été réalisée en utilisant PHASTER (*PHAge Search Tool Enhanced Release*), une interface web d'identification et d'annotation des séquences de phages dans les génomes bactériens ou dans les plasmides à partir des génomes assemblés ou annotés (Arndt

et al., 2016). Son principe est basé sur une recherche par homologie de séquences protéiques (BLASTP) dans une base de données de gènes spécifiques aux phages tels que les gènes impliqués dans la lyse, la réplication et la morphogénèse du phage. Une fois que toutes les régions du phage ont été détectées, un score de complétude est attribué à chaque phage identifié. Trois scénarios possibles sont alors envisagés :

- (i) la région ne contient que des gènes/protéines d'un phage connu ;
- (ii) plus de 50 % des gènes/protéines de la région sont apparentés à un phage connu
- (iii) moins de 50 % des gènes/protéines de la région ont un phage connu.

Dans le scénario (i), la région a automatiquement un score de complétude de 150 (le maximum) indiquant la détection d'un phage connu intact. Ce score de complétude est calculé par l'addition des scores correspondant à la taille et au nombre de gènes de la région.

Dans les scénarios (ii) et (iii), s'il s'avère que la région est liée à un phage connu, les deux scores sont calculés en utilisant la taille et le nombre de gènes appariés du phage correspondant, sinon ils sont calculés en utilisant la taille moyenne (30 kb). Une région de phage est considérée comme incomplète si son score de complétude est inférieur à 60, incertain « questionnable » si le score est compris entre 60 et 90, et intacte si le score est supérieur à 90.

Comparé aux outils de détection des phages existants tels que Phage Finder, Profinder l'interface PHASTER a un double avantage qui est la rapidité et la performance de détection (40 fois plus rapide et 15 % plus précis que Phage Finder et ProFinder (Zhou et al., 2011).

2.2.8.2. Détection des plasmides

Afin de caractériser les types de plasmides portés par les souches de *C. perfringens*, une approche par BLAST des génomes assemblés dans la base de données plasmidiques a été réalisée sous Linux. Les métriques BLAST ont été paramétrés à une identité de 90 % et un taux de couverture de 65%. Les plasmides identifiés ont été confirmés en utilisant l'interface web *OriTfinder* (Li et al., 2018) qui consiste à identifier les origines de site de transfert (*OriT*) d'un plasmide conjugatif ainsi que deux autres gènes putatifs de la relaxase T4CP et T4SS.

2.2.8.3. *Identification des systèmes CRISPR-Cas*

Les gènes CRISPR-Cas ont été recherchés en utilisant l'interface web CRISPRCasFinde (Couvin et al., 2018). Cette interface permet l'identification à la fois des loci CRISPR et des protéines Cas associées à partir des génomes assemblés (fichier fasta). Les paramètres par défaut à savoir un nombre minimal de 3 répétitions pour une longueur minimale de 23 nucléotides et une longueur maximale de 55 nucléotides ont été conservés.

2.2.8.4. *Identification des gènes de résistance aux antimicrobiens*

La mise en évidence des gènes codant la résistance aux antimicrobiens a été réalisée par BLASTn (90 d'identité et un taux de couverture de 65 %) en utilisant la base de données CARD (*Comprehensive Antimicrobial Resistance Database*) (Jia et al., 2017). C'est une base de données bio-informatique sur les gènes de résistance, leurs produits et les phénotypes associés. Elle fournit une source unique d'information sur les gènes de résistance, y compris les données aux niveaux moléculaire et clinique et les données de surveillance.

2.3 Résultats

2.2.9. Statistiques sur l'évaluation de la qualité de l'assemblage

La normalisation des *reads*-paireés a permis d'obtenir en moyenne une couverture en profondeur de 350X et un taux de couverture de 87 % sur le génome de référence. Elle a permis également d'obtenir un assemblage pertinent avec un nombre réduit des contigs de petites tailles (200 à 50000 bp) et de grands *scaffolds* de tailles proches de la taille du génome de référence. La taille de plus grands *scaffolds* varie entre 2,6 et 3,3 millions de bp (Mbp) avec une moyenne de 3,0 Mbp en parfaite concordance avec la taille attendue du génome de *C. perfringens* (Myers et al., 2006) et une teneur moyenne en guanine cytosine (GC) de 28 %. La **figure 16** résume l'évaluation de la qualité de l'assemblage des 146 génomes réalisé dans cette étude. Les informations sur la variation des tailles et le contenu en gènes par génomes sont résumés dans l'annexe 4.

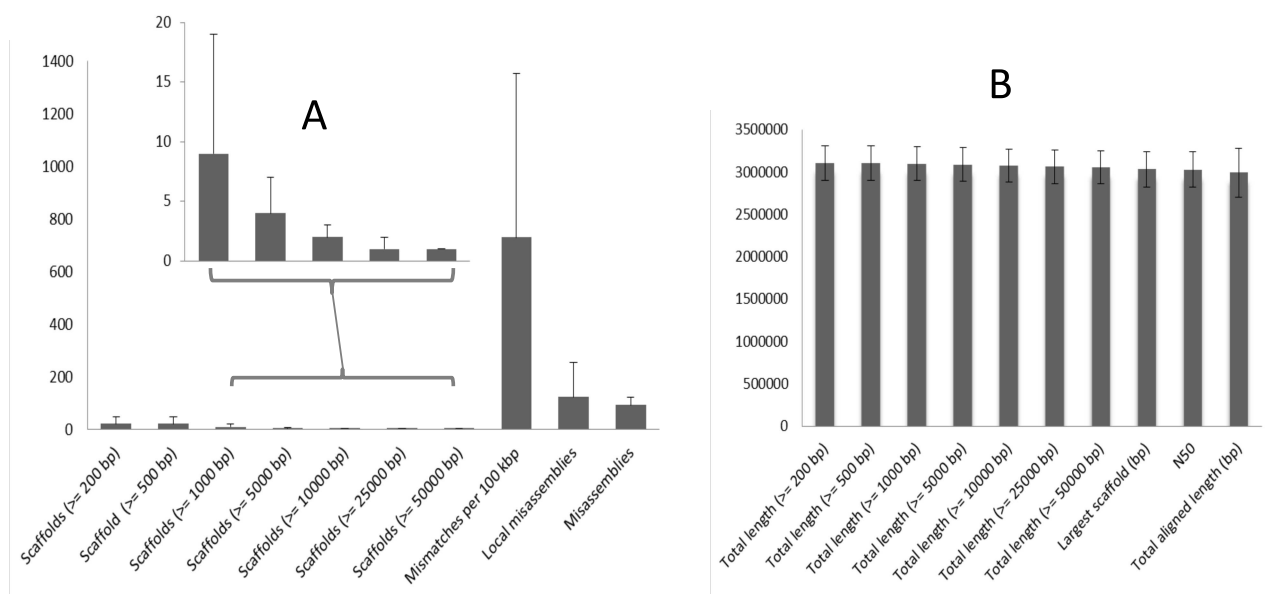


Figure 16. Evaluation des paramètres de l'assemblage montrant la moyenne du nombre de petits contigs (A) et la taille de grands contigs (B).

2.2.10. Inférence phylogénomique core-génome de la collection

L'inférence phylogénomique a été réalisée sur la base d'une analyse SNP sur 1033 gènes du core-génomes (gènes présents dans au moins 99 % des souches analysés). La description

détaillée de la collection des souches de *C. perfringens* issues des TIAC en région parisienne (annexe 1) indique que dans 30 TIAC, entre 2 et 8 isolats ont été collectés par TIAC. D'après les résultats de nos analyses sur les profils de gène de virulence, il a été démontré que dans 19 de ces 30 TIAC, les isolats présentaient des profils de gènes de virulence identiques homogènes en présence du gène *cpe* (15 TIAC) ou en absence du gène *cpe* (4 TIAC).

L'inférence phylogénomique basée sur la variation du core-génome de l'ensemble de notre collection (146 souches issues de 44 TIAC) a montré que des souches issues d'une même TIAC avec des profils de gènes de virulence identiques peuvent néanmoins être génétiquement éloignées. Dans 16 des 19 TIAC à profils homogènes, les souches isolées d'une même TIAC se sont révélées également identiques au niveau de la variation du core-génome (**Tableau 7**), ce n'est pas le cas pour 3 épisodes toxiques dans lesquelles uniquement des souches *cpe+* ont été isolées. Ainsi, parmi les 5 isolats les souches *cpe+* collectées de la TIAC 2773, une souche était très éloignée des 4 autres avec une moyenne de 2893 ± 4688 SNP. Il en est de même pour les TIAC 4138 et 3958 où une et deux souches *cpe+*, respectivement présentait des variations de 1378 ± 489 et de 7952 ± 1311 SNP. Ces résultats indiquent donc que des souches pathogènes *cpe+* génétiquement éloignées peuvent contaminer le même aliment. Ce résultat a d'importantes implications dans le cadre de l'analyse microbiologique des TIAC et soulève la question du nombre d'isolats qu'il est nécessaire d'obtenir pour caractériser un aliment contaminé.

Pour les autres TIAC à souches uniquement *cpe+*, l'analyse phylogénomique des gènes du core-génome a confirmé l'implication de souches génétiquement proches dans les différents épisodes toxiques. Elle a également montré que des souches génétiquement proches ont été impliquées dans des épisodes toxiques différents : il s'agit des TIAC 2291, 2727 et 2773 et des TIAC 2774, 2788 et 2987 survenues dans des départements différents. Les souches impliquées dans ces TIAC sont toutes issues d'aliments à base de viande de volaille. Les produits alimentaires surtout les plats cuisinés sont constitués de nombreux ingrédients qui peuvent rendre complexe l'identification de la matrice d'origine du pathogène. Cependant, l'implication de souches génétiquement proches issues d'une même matrice alimentaire, ici la volaille, suggère fortement la présence d'un ou de marqueurs spécifiques d'adaptation du pathogène à cette matrice. Concernant les TIAC dans lesquelles uniquement des souches *cpe-* à profils de gènes de virulence homogènes ont été isolées (TIAC 3968, 4058 et 1270), l'analyse

sur la base du core-génome a confirmé la proximité génétique des souches dans chaque épisode toxique.

Tableau 7. Comparaison des souches sur la base de leurs profils de gènes de virulence (GV) et leur variation génomique

TIAC	Souches collectées (n)	Comparaison des souches <i>cpe+</i>				
		Souches identiques		No de profil GV	Moyenne SNP	Ecart-type
		Profil GV	Core-génome			
538	7	7	7	V	18	±10
2291	5	5	5	V	59	±21
2773	5	5	4	VII	2893	±4688
2774	5	5	5	VII	16	±47
2987	8	8	8	VII	15	±21
4092	4	4	4	IV	28	10±
4127	4	4	4	VI	35	±42
4138	3	3	2	X	1378	±489
490	5	5	5	V	13	±39
1923	5	5	5	VII	19	±30
3566	5	5	5	IV	26	±13
4430	5	5	5	VII	12	±11
4755	5	5	5	V	14	±23
759	5	5	5	II	33	±22
762	4	4	4	II	15	±42
Comparaison des souches <i>cpe-</i>						
3958	5	5	3	XI	7952	±1311
4068	2	2	2	X	12	±19
1270	5	5	5	X	20	±11
1781	5	5	5	XI	26	±82

2.2.11. Distribution des souches de *C. perfringens* en fonction de leurs origines alimentaires

Comprendre les relations phylogénétiques des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC est important dans les enquêtes épidémiologiques pour tenter d'identifier les sources de contamination et les réservoirs des souches pathogènes. Les données de séquençage du génome complet notamment l'inférence phylogénomique basée sur les SNP du core-génome sont actuellement largement utilisées pour attribuer les sources de contamination des aliments par les souches responsables de cas de TIAC (Thépault et al., 2017). De plus, la précision du typage SNP peut permettre d'identifier les souches qui se sont adaptées à un environnement donné et fournir ainsi une information importante pour déduire la source de contamination (Revez et al., 2017). Néanmoins, notre analyse phylogénomique n'a pas permis d'établir un lien évident entre phylogénie et l'origine alimentaire des souches

(Figure 17). Toutefois, deux clades bien distincts regroupent des souches isolées d'aliments à base de viande de volaille : le premier clade regroupe les souches isolées des TIAC 490 et 538 et le second clade regroupe les souches impliquées dans les TIAC 2773, 2774, 2987 et une souche de la TIAC 2988. De même, un regroupement de souches d'origine végétale est observé pour trois TIAC 3863, 1923 et 4755. Ces résultats sont très partiels et demanderont à être confirmés en élargissant les observations mais ils illustrent l'intérêt de croiser les informations génomiques et épidémiologiques pour approfondir notre connaissance de l'origine des contaminations.

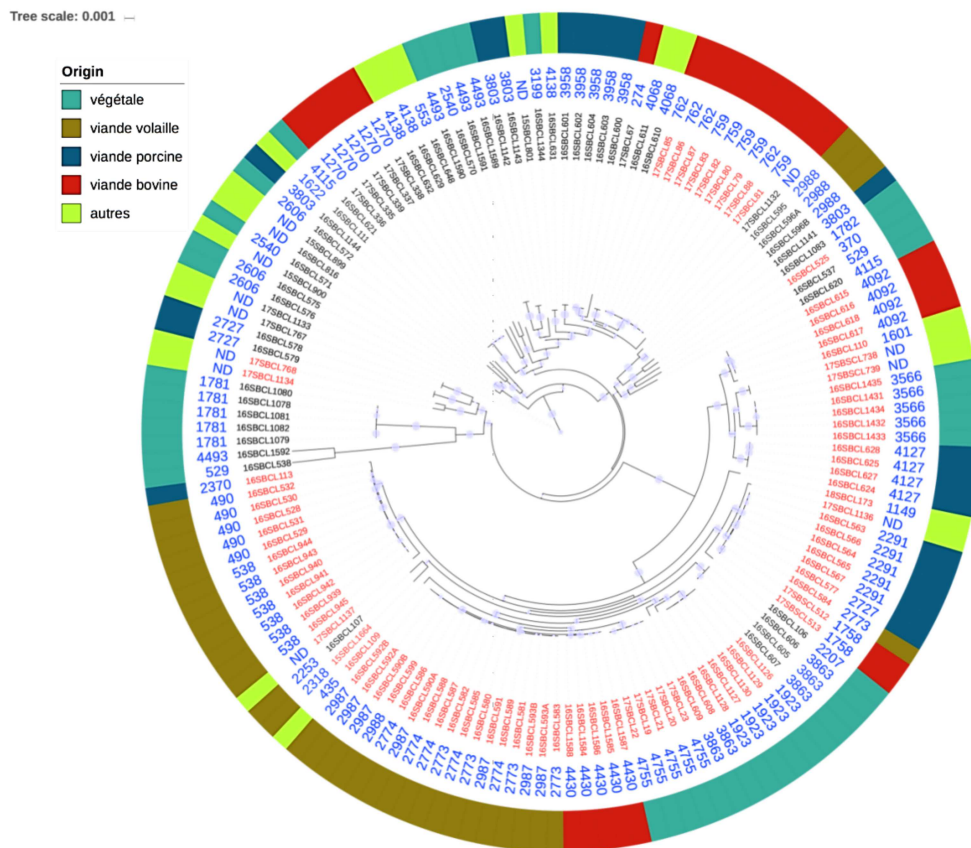


Figure 17. Phylogénie en maximum de vraisemblance basée sur la variation de polymorphismes nucléotidiques (SNP) du core-génome obtenu par iVARCall2 de 146 souches de *C. perfringens*. L'anneau intérieur indique les numéros des souches. Les chiffres en bleu correspondent aux numéros des TIAC. L'anneau extérieur correspond aux matrices alimentaires.

2.2.12. Étude comparative du core-génome et pan-génome

Alors que les souches de *C. perfringens* sont bien connues pour leurs capacités à coloniser des biotopes très variés mais également à causer des troubles intestinaux chez l'Homme et les animaux (Goossens et al., 2017; Li et al., 2013), l'influence de ces divers environnements sur la composition et le contenu génomique de *C. perfringens* n'a pas encore été bien élucidée (Kim et al., 2017). Nous avons donc réalisé une analyse pan-génomique de notre collection de souches de *C. perfringens* issue de TIAC. La construction du pan-génome a permis d'identifier au total 16310 gènes (**Figure 18**). Parmi ceux-ci, 1033 gènes core correspondant à 6 % du total et représentant les gènes présents dans au moins 99 % des souches analysées et 5485 gènes uniques (34 %) étaient présents dans une seule souche de la collection. Le reste soit 9 792 gènes (60 %) constitue le génome accessoire. Ces résultats suggèrent une très grande plasticité du génome de *C. perfringens* plus que tout autre procaryote actuellement connu et publié (McInerney et al., 2017).

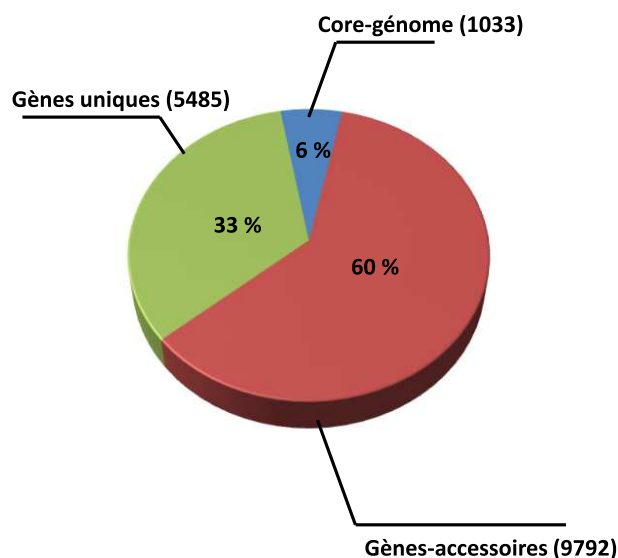


Figure 18. Pan-génome des 146 souches de *C. perfringens* montrant les proportions des gènes core, présents dans au moins 99 % des souches, des gènes accessoires présents dans 2 souches ou plus, mais moins de 99 % des souches et des gènes uniques présents dans une seule souche.

Une tendance se dégage de l'analyse de données du pan-génome qui montre une augmentation du nombre de gènes de celui-ci à chaque ajout de nouveaux génomes indiquant que notre collection ne couvre pas l'ensemble de la diversité génétique de l'espèce et un pangénome qui évolue par acquisition et diversification génétique (**Figure 19**).

Une comparaison de la distribution des classes fonctionnelles issues de l'analyse des COG montre que les gènes codant les protéines associées au métabolisme de base sont comme attendu surreprésentés dans le core-génome. Sur la base de l'annotation fonctionnelle des COG, 46 % des gènes core ont été assignés à des protéines impliquées dans le transport et métabolisme des lipides, des glucides, des acides aminés et des coenzymes, dans la traduction, la structure et la biogénèse des ribosomes et dans la transcription (**Figure 20**). Les gènes codant les protéines impliquées dans la réplication, recombinaison et réparation, dans la biogénèse de la paroi, des membranes et de l'enveloppe et dans les mécanismes de défense et virulence sont considérablement surreprésentés (1686 gènes, 24,23 %) parmi les gènes accessoires. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle les gènes accessoires servent de pool génétique pour l'adaptation de *C. perfringens* à différentes niches écologiques. L'analyse des gènes codant les protéines assignées aux fonctions de réplication, recombinaison et réparation représentent 7,2 % des gènes accessoires et 22 % des protéines codées par les gènes uniques (**Figure 21**). L'analyse fonctionnelle de ces protéines indique qu'elles sont associées principalement aux protéines impliquées dans le transfert horizontal du mobilome notamment les transposases (237 gènes), les intégrases (61 gènes) et les phages (64 gènes). La distribution des classes fonctionnelles montre également une forte proportion de gènes codant les protéines de fonction inconnues dans le génome accessoire (2488 gènes, 35,76 %) et le core-génome (274 gènes, 28,28 %).

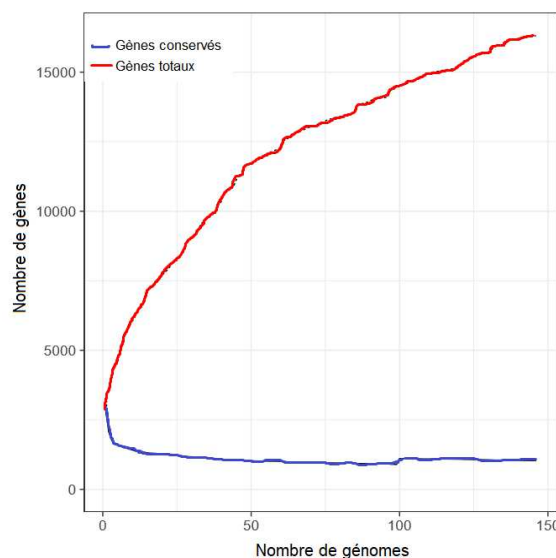


Figure 19. Nombre de gènes totaux et conservés dans le pan-génome de la collection.

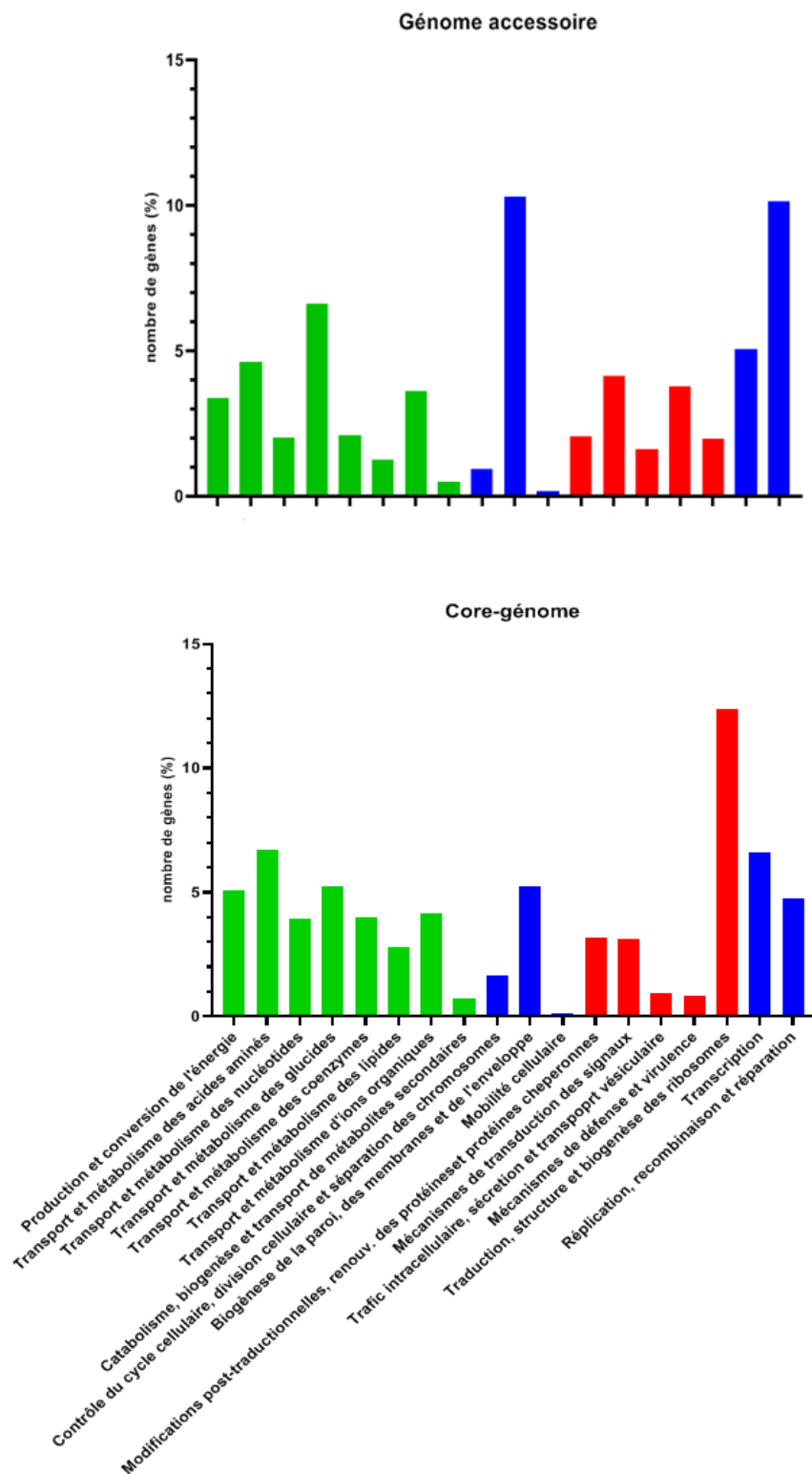


Figure 20. Répartition fonctionnelle des protéines COG prédites par les gènes core et les gènes accessoires

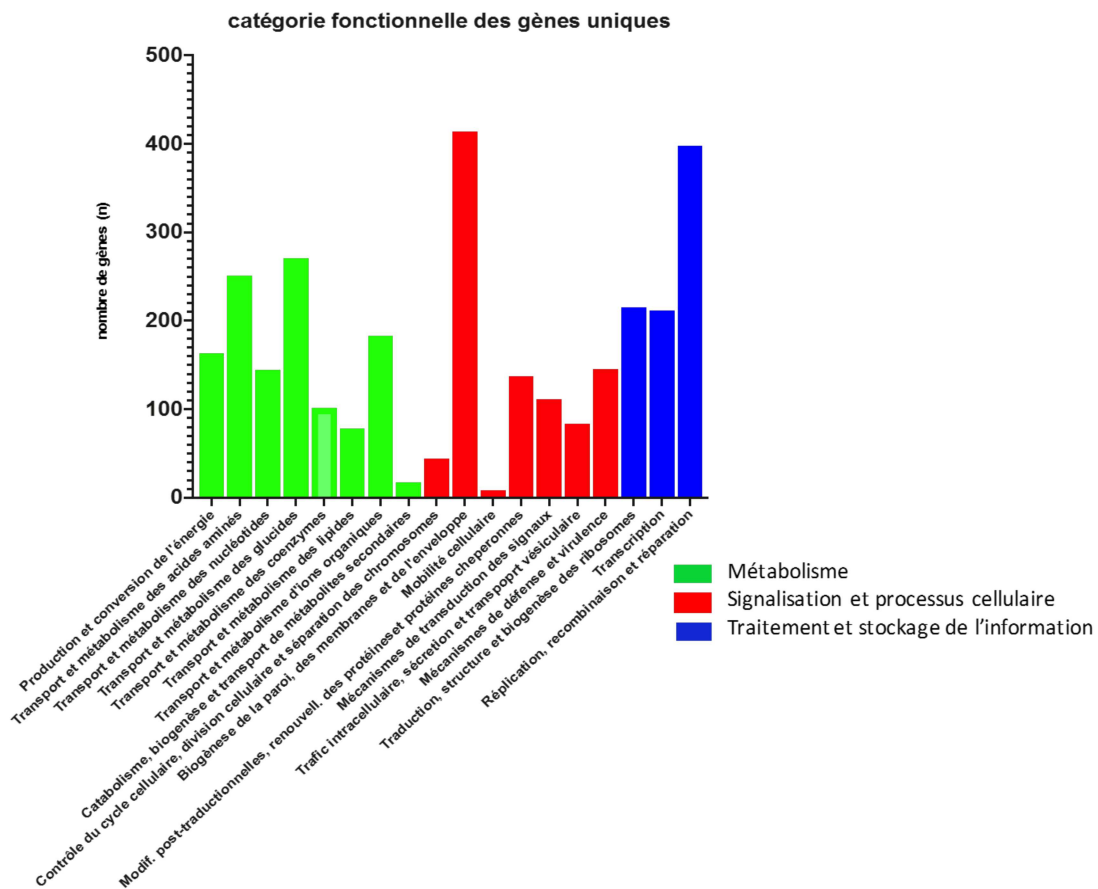


Figure 21. Répartition fonctionnelle des protéines COG prédites par les gènes uniques. Les couleurs représentent les grandes fonctions métaboliques.

2.2.13. Identification des marqueurs spécifiques

Afin d'identifier des marqueurs spécifiques aux souches *cpe+* et *cpe-*, nous avons identifiés dans le pan-génome 952 gènes communs aux souches *cpe+* et 866 gènes communs aux souches *cpe-* (**Figure 22**). La comparaison de ces gènes a permis d'identifier 132 gènes spécifiques aux souches *cpe+* et 46 gènes spécifiques aux souches *cpe-*. Cette comparaison a en outre permis d'identifier 820 gènes présents dans le génome de toutes les souches à la différence du core-génome défini précédemment (présence dans au moins 99%) (**Figure 20**). Il est intéressant de noter que près de la moitié (40 %) des gènes spécifiques dans les deux populations codent pour des protéines de fonctions inconnues (protéines hypothétiques).

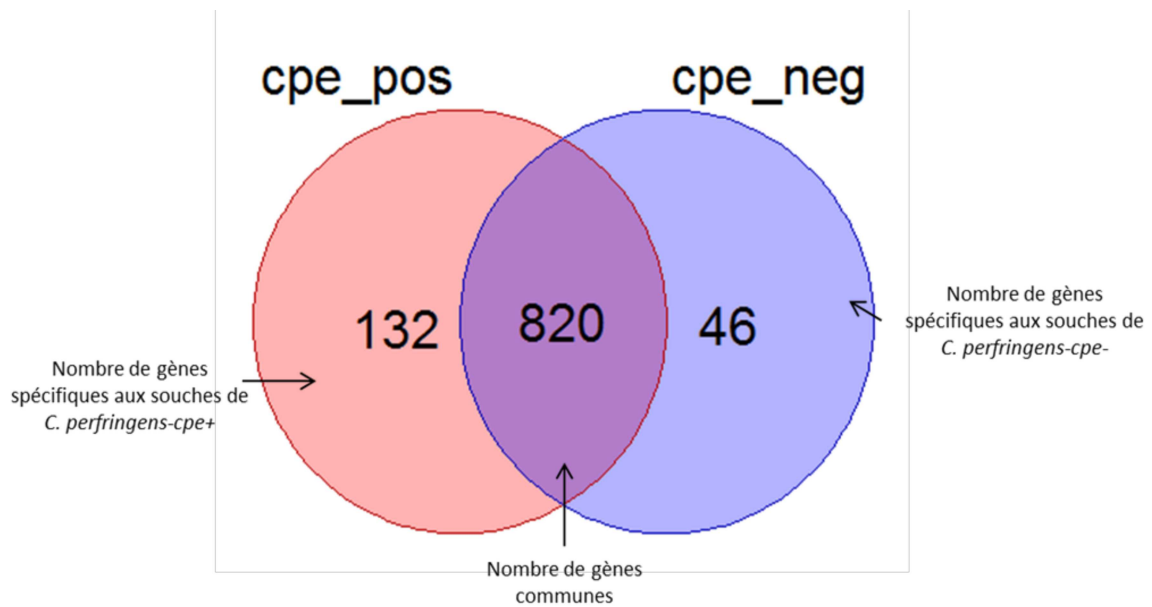


Figure 22. Diagramme de comparaison des gènes communs et spécifiques aux souches de *C. perfringens* possédant le gène *cpe* (*cpe+*) et dépourvues du gène *cpe-*

Mise à part les protéines assignées aux fonctions de base, métabolisme, et les protéines de fonctions inconnues présentes en proportion similaires dans les deux populations (**Figure 23**), l'analyse fonctionnelle des séquences protéiques codées par les gènes spécifiques révèle une présence associée aux fonctions de transcription, réplication, recombinaison et réparation en proportion élevée (13,7 % pour les souches *cpe+* et 7,3 % pour les souches *cpe-*).

Il est intéressant de noter que dans les souches *cpe+*, 5 % des gènes spécifiques sont associés à la genèse de la paroi et de l'enveloppe, tandis que ces gènes sont absents dans les souches *cpe-*. La présence de ces gènes uniquement dans les souches *cpe+* expliquerait leur résistance aux stressés comme la chaleur à la différence des souches *cpe-*.

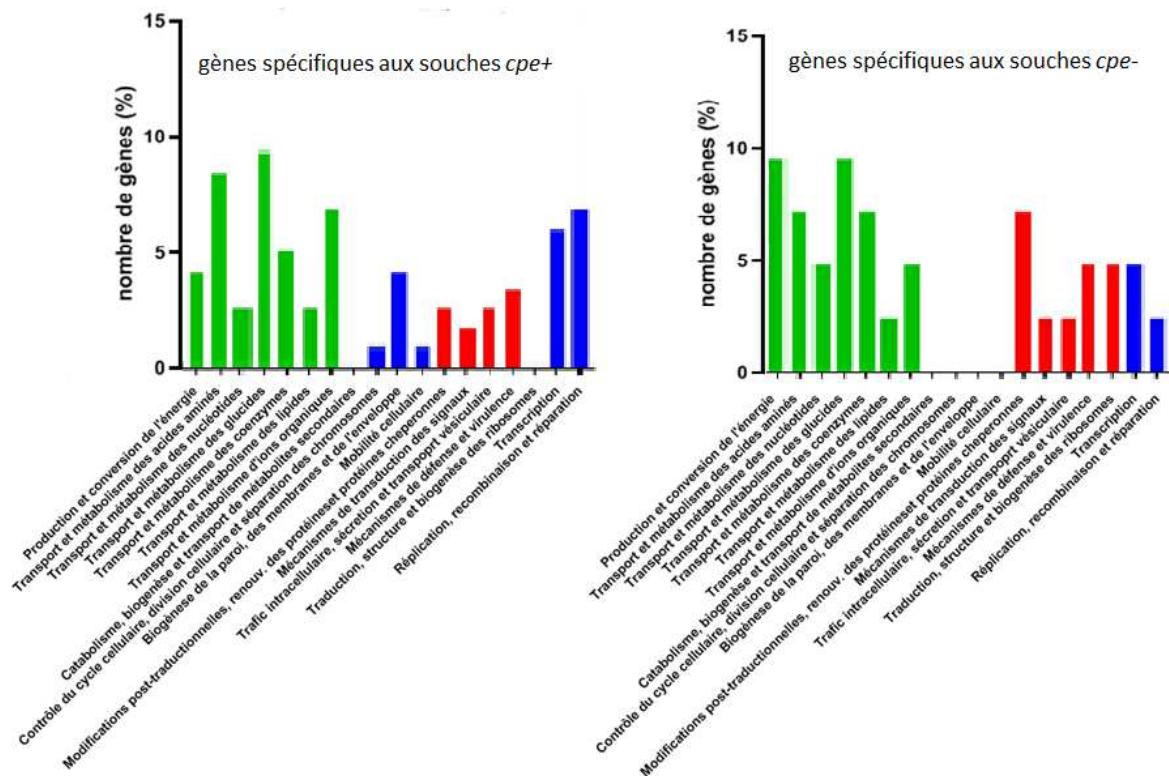


Figure 23. Distribution fonctionnelle des COG prédites par les gènes spécifiques aux souches de *C. perfringens* *cpe+* et *cpe-*

2.2.14. Caractérisation des souches en fonction des éléments génétiques mobiles

2.2.14.1. Identification des plasmides

La virulence de *C. perfringens* est due principalement à la production de ses 24 toxines et facteurs protéiques comme les enzymes hydrolytiques (Goossens et al., 2017). Plus de la moitié des gènes codant ces toxines sont localisés sur des plasmides (Revitt-Mills et al., 2015). Les plasmides de *C. perfringens* portent également des gènes qui codent pour d'autres fonctions pouvant augmenter la virulence de *C. perfringens* telles que la résistance aux antimicrobiens et la régulation du métabolisme (Bannam et al., 2011; Li et al., 2013). Une détection par BLAST à partir d'une base de données des plasmides a été réalisée dans l'ensemble des génomes de notre collection. Sur les neuf types de plasmides de *C. perfringens* actuellement décrits (Adams et al., 2015; Bannam et al., 2006; Li et al., 2013), cinq ont été détectés dans notre collection. La **figure 24** montre la répartition des plasmides détectés au sein de notre collection

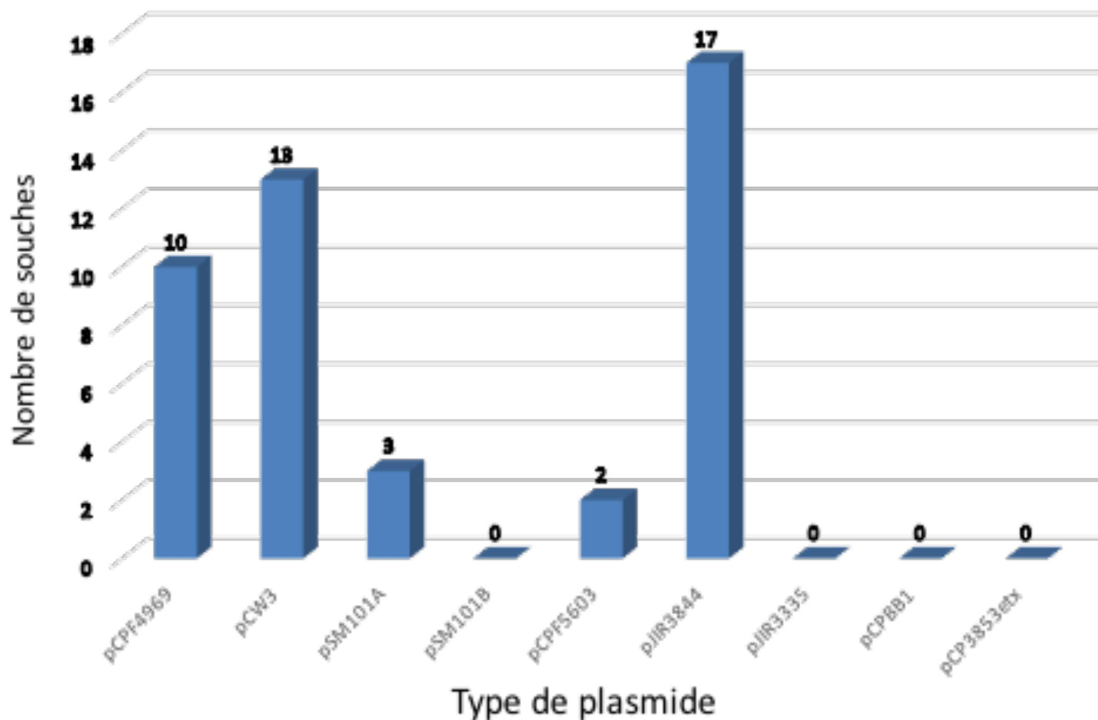


Figure 24. Types de plasmides et le nombre des souches détectées dans notre collection de *C. perfringens*

Le plasmide le plus retrouvé est pJIR3844 qui a été détecté dans 17 souches. Ce plasmide est connu comme porteur du gène *cpb2*. D'autres plasmides porteurs de facteurs de virulence ont également été identifiés dans notre collection. Le plasmide pCPF5603 a été détecté dans deux souches. Ce plasmide est décrit comme porteurs de deux gènes de virulence, le gène *cpb2* et le gène *cpe* (Parreira et al., 2012). Le gène *cpe* peut être également localisé sur le plasmide pCPF4969 qui a été détecté dans 10 souches. Afin de pouvoir identifier le plasmide portant le gène *cpe* (pCPF5603 ou pCPF4969), une reconstruction de deux plasmides a permis de déterminer que dans 10 souches *cpe+* plasmidiques, le plasmide portant le gène *cpe* était le plasmide pCPF4969. Le plasmide pCPF5603 n'a été détecté que dans deux souches *cpe+* plasmidiques, 17SBCL768 et 17 SBCL1134.

2.2.14.2. Profils de résistance aux antimicrobiens (détection *in silico*)

C. perfringens est connu pour être porteur de plasmides qui codent les protéines associées à sa virulence y compris les toxines et les gènes codant les antimicrobiens (Kim et al., 2017). Le transfert horizontal de ces plasmides entre les souches de *C. perfringens* a été démontré

par plusieurs auteurs (Li et al., 2013; Miyamoto et al., 2002; Revitt-Mills et al., 2015) et permet aux souches d'acquérir de nouvelles résistances. L'usage des antibiotiques en production animale, parallèlement à leur usage en médecine humaine, participe à la pression de sélection favorisant l'émergence des souches porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques. Afin d'évaluer la nature et l'ampleur de l'antibiorésistance des souches de *C. perfringens* isolées des aliments impliquées dans les intoxications alimentaires, une détection *in silico* des gènes codant les protéines de résistance aux antimicrobiens a été réalisée (**Figure 25**). Le gène *mprF* « anti-défensin » codant pour une protéine associée à une multirésistance y compris la gentamycine a été détecté dans tous les génomes analysés (100 %). Les gènes *tetA(P)* et *tetB(P)* codants pour la résistance à la tétracycline ont été détectés respectivement dans 89 et 19 souches. Les gènes *tetA (P)* et *tetB(P)* sont portés par le plasmide pCW3 et d'autres plasmides de *C. perfringens* très proche comme le pCW3-like. La résistance à la bacitracine, un antibiotique à large spectre, a été observée dans les souches d'origine aviaire probablement lié à son utilisation fréquente dans les élevages de ce secteur. Une forte présence du gène codant pour cet antibiotique a été retrouvée dans les isolats de *C. perfringens* de notre collection avec 118 souches porteuses de la résistance. Enfin, le gène *ermQ* codant la résistance à l'érythromycine a été trouvé dans une seule souche.

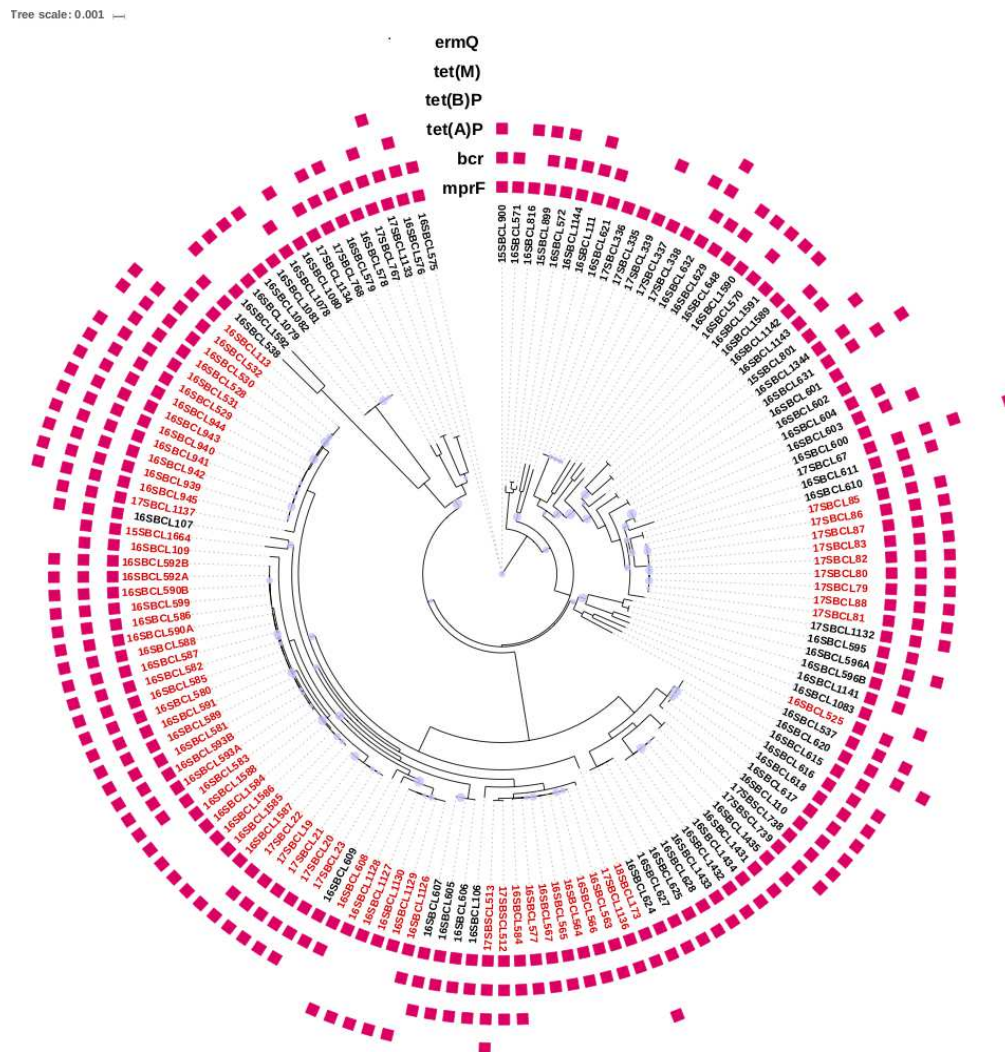


Figure 25. Distribution des gènes codant la résistance aux antimicrobiens

2.2.14.3. Présence de phages

La détermination de la variabilité génomique des souches de *C. perfringens* aide à comprendre la pathogénicité et l'épidémiologie des souches pathogènes et non pathogènes (Lacey et al., 2016). Cette variabilité semble être influencée par des éléments génétiques mobiles dont les phages (Kiu et al., 2017) qui représentent une importante source de diversité génétique. Au total, 13 types de phages intacts infectant *C. perfringens* ont été identifiés (**Figures 26 et 27**). La présence d'un à sept phages a été identifiée dans 107 souches. Le phage ϕ 2636 est le plus représenté (n=45) suivi du phage CpeS_CP51 (n= 37). Cette forte présence s'explique par l'implication de ces phages dans la sporulation de *C. perfringens* (Kim et al.,

2012). En outre, une grande diversité de phages associés aux populations *cpe+* et *cpe-* a été observée. Ainsi des phages associés aux genres *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter* et *Geobacter* ont été identifiés. Dans 28 % des souches de la collection, aucun phage n'a été détecté. Notre analyse révèle que l'absence de phage n'est pas associée à une population donnée. Sur les 41 souches où aucun phage n'a été détecté, 21 sont des souches *cpe+* et 20 sont des souches *cpe-*. Bien que les profils phagiques dans les souches issues d'une TIAC à profils de gènes de virulence homogènes peuvent être identiques comme dans les TIAC 1270, 762, 759, 1781, 538, et 1923, en revanche pour d'autres TIAC, les profils phagiques observés sont différents. De plus, aucun profil phagique caractéristique à un clade particulier n'a été mis en évidence. Ainsi, la distribution des phages au sein des souches de notre collection apparaît sans lien avec la phylogénie core génome. Cette observation, nous a conduits à la recherche d'autres mécanismes permettant de réguler les échanges d'éléments génétiques mobiles afin de comprendre cette diversité pan-génomique.

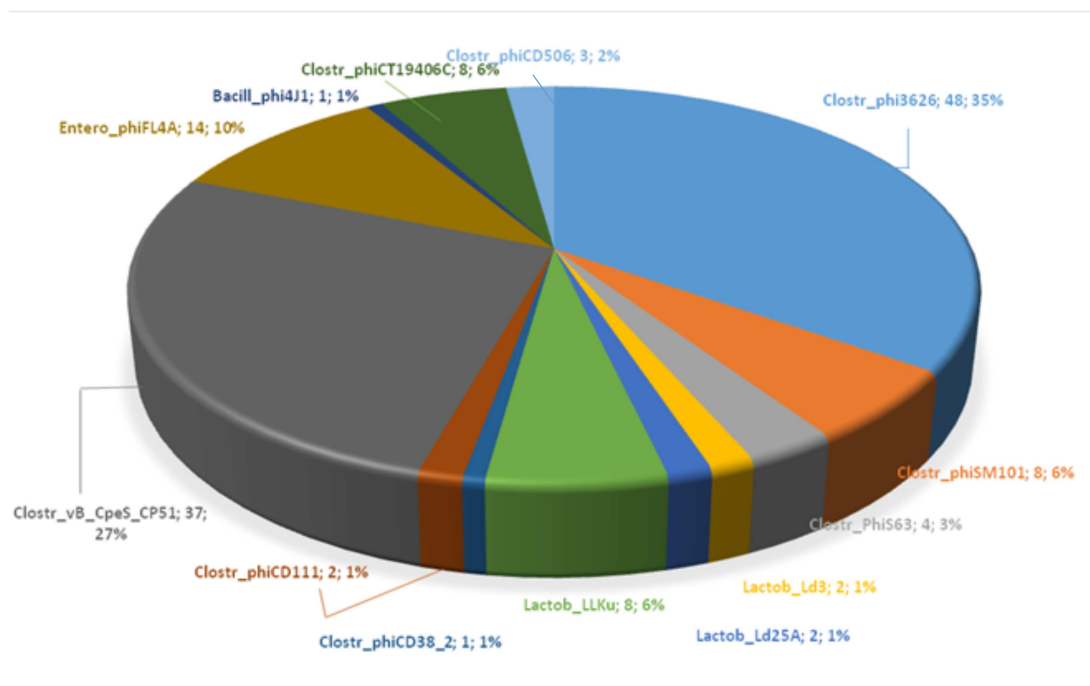


Figure 26. Répartition des phages détectés dans la collection de *C. perfringens*

2.2.14.4. Détection et analyse comparative de systèmes CRISPR-Cas

121

146 (64 %) génomes analysés possèdent des loci CRISPR (**Figure 28**). Le nombre de loci par génome varie de 1 à 6. Aucune distinction n'a été observée entre les souches *cpe+* et *cpe-* sur la base du nombre de loci CRISPR. En revanche, une corrélation négative a été constatée entre ce nombre et la présence de phages dans les souches ($R = -0.2$, $p = 0,26$). En effet, les souches possédant entre 4 et 6 loci CRISPR associés au système Cas étaient dépourvues de séquences de phages.

Sur la base de la nomenclature des systèmes CRISPR-Cas (Makarova et al., 2011), le sous-type I-B a été détecté dans 72 des 103 loci CRISPR mis en évidence, le type II-C dans 3 génomes et le type 2 dans 2 génomes analysés. Cependant, aucun gène *Cas* n'a été détecté dans les loci CRISPR de 17 génomes indiquant des loci non fonctionnel et donc incapable de procurer une immunité adaptative des souches contre une invasion extérieure due à des phages et/ou des plasmides. L'analyse des Cas associées au type II-B a mis en évidence deux groupes de protéines Cas. Le premier groupe (complet) se compose de l'ensemble des Cas (Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7 et Cas8a1) a été identifié dans 92 % (68/73) des génomes associés au CRISPR-Cas de type I-B. Un autre groupe dépourvu des Cas1, Cas2 et Cas4 a été identifié dans 5 génomes. Ce dernier a été considéré comme un locus CRISPR non fonctionnel et donc incapable d'intégrer de l'ADN étranger du fait de l'absence des gènes codant les protéines Cas1, Cas2 et Cas4 (Woudstra et al., 2016). En effet, Cas1 est impliquée dans l'intégration de l'ADN viral ou étranger « spacer » dans les répétitions CRISPR du génome bactérien, Cas2 facilite la sélection et/ou l'intégration du « spacer » et Cas4 serait associée à l'acquisition du « spacer » (Makarova et al., 2015). Notre analyse de détection de loci CRISPR a permis d'identifier dans les mêmes génomes notamment des souches 16SBCL1144, 16SBCL106 et 17SBCL1132 des systèmes CRISPR-Cas actifs avec tous les gènes Cas associées et des systèmes CRISPR-Cas potentiellement inactifs dépourvus du gène codant Cas4. Enfin, aucun locus CRISPR n'a été détecté dans 43 génomes.

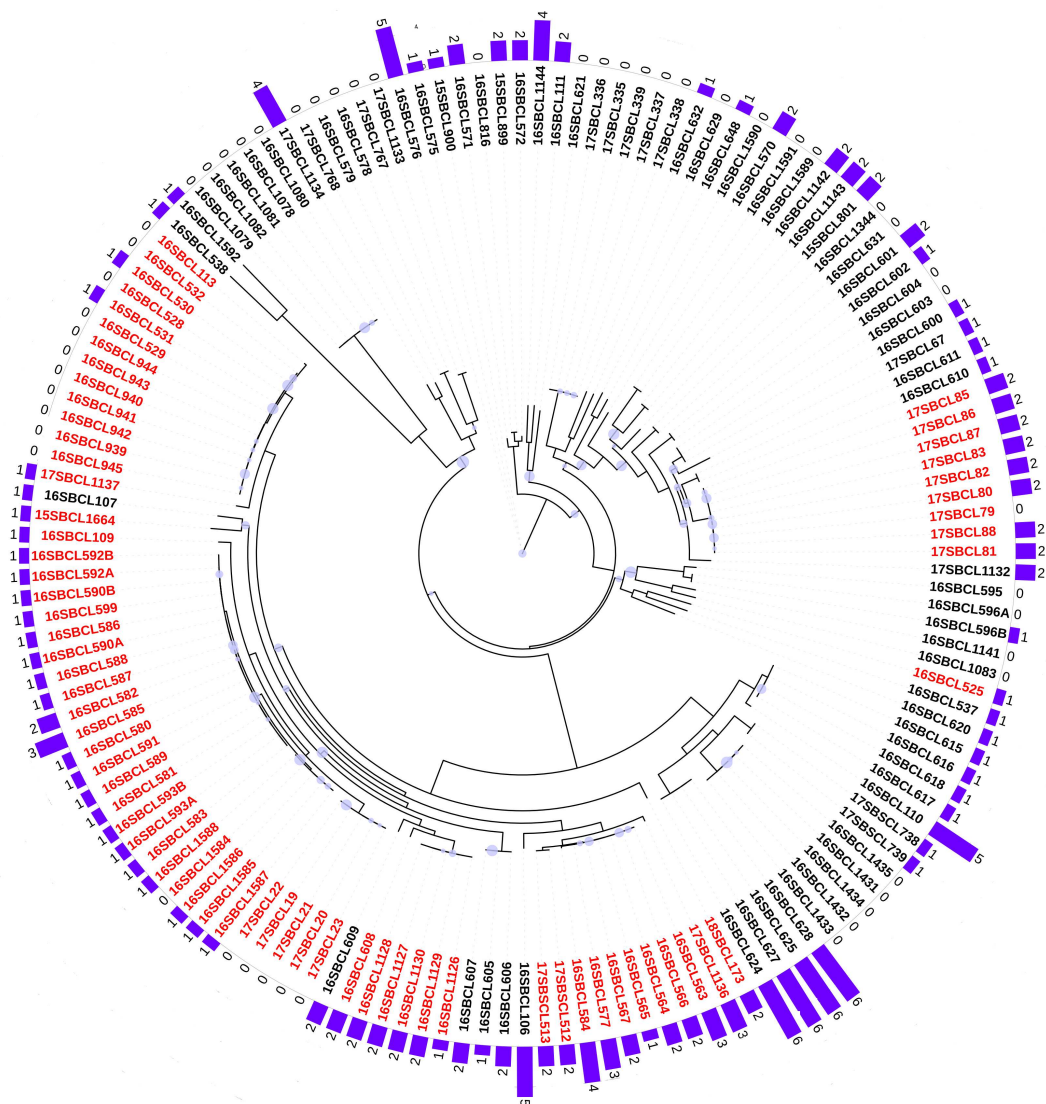


Figure 28. Nombre de locus CRISPR détectés dans les génomes de *C. perfringens*.

2.3. Discussion

2.3.1. Analyse phylogénomique de la collection

C. perfringens représente la quatrième cause de TIAC en France avec en moyenne plus de 100 foyers par an touchant plus de 1 500 personnes en 2016 (Santé publique France 2017). Explorer la diversité génomique des souches impliquées dans les épisodes toxiques est important pour le suivi épidémiologique, car cela peut permettre d'identifier les réservoirs à l'origine des contaminations. Les TIAC à *C. perfringens*, espèce non réglementée, ne font à ce jour l'objet d'aucune investigation approfondie en routine. L'identification de 15 profils de gènes de virulence nous a permis de mettre en évidence une diversité des souches au regard du gène *cpe*. Cette diversité génétique a été confirmée par une inférence génomique basée sur la variation du core-génome d'une collection représentative de 58 souches. L'analyse génomique a également permis de mettre en évidence de souches génétiquement distinctes associées à une même TIAC. L'inférence phylogénomique de la collection représentative a permis également de séparer en deux clades distincts, les souches *cpe+* chromosomiques des souches *cpe+* plasmidiques et *cpe-*. Nous avons élargi notre analyse génomique à toute la collection de 146 souches de *C. perfringens* issues de 44 TIAC survenues en région parisienne. La phylogénie du panel élargi qui a confirmé la présence des 2 clades.

L'analyse génomique a montré que les deux groupes de TIAC (2774, 2788 et 2987) et (2291 et 2727) associées à la viande de volaille sont causées par des souches génétiquement proches. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par une étude sur la filière volaille, dans laquelle des souches de *C. perfringens* d'origine géographique et de date d'isolement variées se sont avérées génétiquement proches (Lacey et al., 2018). Ces données suggèrent que certains génotypes pourraient être liés à certains environnements ou réservoir au sein desquels ils pourraient être soumis à une pression de sélection particulière. La grande diversité des souches de *C. perfringens* *cpe*-plasmidique ou ne possédant pas le gène *cpe* peut s'expliquer par la coexistence des souches *cpe-* présentes dans le microbiote intestinal de l'Homme, des animaux et dans l'environnement qui peuvent contaminer les aliments (Afshari et al., 2016).

2.3.2. Description fonctionnelle du pan-génome

L'étude de la diversité génomique des souches de *C. perfringens* est un élément important permettant la compréhension des bases génétiques du potentiel de virulence et l'épidémiologie dans le contexte de TIAC. Les études du pan-génome permettent une analyse détaillée du contenu génomique de l'espèce bactérienne (Tettelin et al., 2008). Peu d'études pan-génomiques réalisées sur *C. perfringens* sont actuellement publiées. Les études génomiques antérieures réalisées sur différents toxinotypes ont mis en évidence une diversité génomique considérable entre les souches de *C. perfringens* isolées des aliments, des animaux, de l'environnement et de l'Homme (Hassan et al., 2015; Kiu et al., 2017). Notre analyse pan-génomique confirme cette notion par l'identification d'un pan-génome très variable et « ouvert » (Figure 19) avec une courbe pour les gènes du pangénome qui n'est pas saturée dans le cadre de notre analyse. Les 146 génomes analysés ont permis de définir un pan-génome composé de 16310 gènes dont 1033 core gènes (6 %), 9792 gènes accessoires (60 %) et 5484 gènes uniques (34 %). Nos résultats montrent un core-génome significativement faible contrairement à d'autres pathogènes qui ont un core-génome assez conséquent comme *Staphylococcus aureus* (56%) (Bosi et al., 2016) *Clostridium difficile* (30 %) (Knight et al., 2017; Scaria et al., 2010) ou *Salmonella enterica* (16 %) (McInerney et al., 2017). Ces résultats sont en concordance avec l'étude de Kiu et al. (2017) qui a montré que *C. perfringens* est la bactérie Gram positive la plus diverse actuellement identifiée avec un core-génome composé de 1470 gènes. Le contenu pan-génomique des bactéries révèle leur capacité à interagir et échanger des gènes en fonction de leur écosystème (Georgiades et al., 2011). Le mode de vie sympatrique se définit comme étant une niche écologique diverse avec de possibilités d'acquérir des matériels génétiques provenant d'autres microorganismes (Markowitz et al., 2012). Les bactéries ayant un mode de vie sympatrique possèdent un pan-génome et un mobilome plus grands et plus diversifiés dus aux échanges fréquents de matériels génétiques entre les bactéries présentes dans les mêmes niches écologiques (Georgiades et al., 2011; Markowitz et al., 2012). Nos résultats de l'analyse du pan-génome révèlent le caractère sympatrique de *C. perfringens* avec un pan-génome ouvert composé de 34 % de gènes uniques. *C. perfringens* est considéré comme l'un des agents pathogènes le plus répandu dans la nature avec une présence dans le sol, les égouts et dans le tractus digestif

de l'Homme et des animaux (McClane, 2003). L'interaction avec d'autres pathogènes dans une large gamme d'hôtes notamment dans le microbiote intestinal de l'Homme, des animaux et l'environnement peut être à l'origine d'un flux d'échanges par transfert horizontal des matériels génétiques expliquant ainsi le nombre élevé des gènes uniques (5484).

L'annotation fonctionnelle des gènes du pan-génome à l'aide de la base de données COG a montré une distribution unique des catégories fonctionnelles entre les trois différents ensembles de pan-génome avec une prédominance des gènes codant les fonctions de base comme le métabolisme, la structure des ribosomes et la transcription dans le core génome (46%). Nos résultats de la distribution fonctionnelle des COG au niveau du core-génome sont comparables à ceux de Kiu et al. (2017) qui ont obtenu 16,8 % de gènes core codant les protéines associées au métabolisme des lipides, glucides et acides aminés, contre 8,3 % des gènes accessoires codant pour les mêmes fonctions.

C. perfringens représente la deuxième cause de TIAC aux USA mais est également parmi les principales causes d'intoxications alimentaires dans de nombreux autres pays comme le Japon, l'Australie, l'Angleterre ou bien les pays en voie de développement (Brynstad and Granum, 2002; Gormley et al., 2011; Gould et al., 2004; Komatsu et al., 2012). A l'exception d'une étude menée au Japon et qui associe des cas de TIAC à des souches de *C. perfringens* non productrices de l'entérotoxine CPE (Yonogi et al., 2014), actuellement seules les souches de type F productrices de la CPE sont décrites comme étant capables de provoquer les symptômes associés aux TIAC (Brynstad and Granum, 2002). Une étude utilisant une approche MLST a démontré que les souches responsables de TIAC forment un groupe génétiquement distinct (Xiao et al., 2012). Les analyses phylogénomiques réalisées dans cette étude ont démontré que les souches *cpe+* chromosomiques sont génétiquement distinctes des souches *cpe+* plasmidiques et *cpe-*. L'annotation des gènes spécifiques aux souches *cpe+* révèle une différence significative au niveau fonctionnel entre les deux populations.

2.3.3. Profils plasmidiques

Les souches de *C. perfringens* sont connues comme porteuses de plasmides qui codent pour des protéines associées aux facteurs de virulence notamment les toxines et les gènes

codant la résistance aux antimicrobiens (Kiu and Hall, 2018; Li et al., 2013). Les premières études réalisées sur les plasmides de *C. perfringens* ont identifié une série de plasmides conjugatifs apparentés (très proches) partageant jusqu'à 35 à 40 kb de séquence identique (Li et al., 2013) indiquant qu'ils appartiennent à la même famille dérivant d'un ancêtre commun (Bannam et al., 2006; Li et al., 2013). La recherche des plasmides dans les séquences de génomes assemblés de notre collection de souches issues d'aliments a permis d'identifier 5 types de plasmides différents : pCPF4969, pCW13, pSM101A, pCPF5603 et pJIR3844. Les plasmides pCPF4969, pSM101A, pCPF5603 ont été décrits comme étant porteurs du gène *cpe* (Li et al., 2013; Miyamoto et al., 2006). Cependant, le nombre de plasmides détectés par analyse BLAST est supérieur au nombre des souches identifiées comme étant *cpe+* plasmidiques. Cette différence s'explique par le fait que les plasmides de *C. perfringens* sont très proches et proviennent d'un ancêtre unique qui a acquis différents gènes de toxines et de résistance aux antibiotiques (Adams et al., 2018, 2015; Bannam et al., 2011, 2006). Il a été suggéré que les plasmides pCPF4969 et pCPF5603 ont acquis au cours de leur évolution le locus IS14670-*cpe*-IS1469 (Bannam et al., 2011; Miyamoto et al., 2006). Les transferts de plasmides conjugatifs entre les souches de *C. perfringens* est connu comme l'un des facteurs principaux contribuant à la diversification, à la virulence et à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (Adams et al., 2015; Bannam et al., 2011; Gohari et al., 2015). Le plasmide pCW3 connu comme étant porteur de gène codant la résistance à la tétracycline a été identifié dans 13 souches. Deux autres plasmides décrits comme étant porteurs des gènes de résistance à la tétracycline ont été identifiés dans notre collection : les plasmides PSM101 pJIR3844. Le plasmide pJIR3844 porte également le gène *cpb2* codant la toxine CPB2. Des études récentes ont mis en évidence les séquences d'un plasmide de résistance à la tétracycline (pCW3-like) dans le toxinotype G producteur de la CPE (Bannam et al., 2011; Rood et al., 2018). Au total, sept plasmides de résistance ont été identifiés dans la base de données faisant ainsi de la résistance à la tétracycline le trait phénotypique le plus répandu dans la population de *C. perfringens* (Li et al., 2013; Miyamoto et al., 2006; Rood et al., 1985). Les échanges de plasmides par transfert horizontal entre les isolats de *C. perfringens* est à l'origine de transfert d'autres éléments mobiles qu'il convient d'identifier (Rood et al., 2018).

2.3.4. Détection des gènes de résistance aux antimicrobiens

Les études sur la résistance de *C. perfringens* aux antimicrobiens (RAM) repose actuellement sur l'isolement de la bactérie et la caractérisation phénotypique des souches d'origine clinique, alimentaire, animale et environnementale (Park et al., 2010; Reller et al., 2009). Cette approche est importante pour caractériser les souches résistantes aux antimicrobiens, mais ne fournit pas d'informations complètes sur les souches potentiellement résistantes, le mécanisme de résistance et la propagation des gènes de résistance dans la chaîne alimentaire. Des études récentes ont démontré le potentiel du séquençage de génome complet dans la surveillance de la résistance aux AMR (Köser et al., 2014; Roemer and Boone, 2013). Le gène *mprF*, codant une anti-défensine impliqué dans la multirésistance a été détecté dans toutes les souches de notre collection. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs (Kiu et al., 2017). La protéine MPRF est impliquée dans la modification de la charge des membranes plasmiques des bactéries par l'incorporation des molécules chargées positivement comme l'aminosarabose, réduisant ainsi l'affinité des peptides antimicrobiens et augmentant la résistance des bactéries (Ernst et al., 2001). La modification de la membrane causée par la protéine MPRF conférerait une résistance aux aminosides et aux glycolipides comme la gentamycine et la vancomycine (Cole et Nizet, 2016; Kiu et al., 2017). La deuxième fréquence la plus élevée correspond au gène *bcr* codant la résistance à la bacitracine, un antibiotique à large spectre couramment utilisé dans l'industrie de la volaille (Han et al., 2015). 80 % des souches analysées (118/146) possèdent ce gène. Le gène *bcr* a été identifié sur le plasmide pCW3-like partageant 35 à 40 kb de similarité avec les autres plasmides de la famille pCW3 (Wisniewski and Rood, 2017). Les premières études réalisées sur la résistance phénotypique aux antibiotiques des souches de *C. perfringens* ont établi une résistance de celles-ci à la tétracycline (Dornbusch et al., 1975; Rood et al., 1985, 1978; Schwartzman et al., 1977). L'analyse génomique des souches isolées des aliments confirme ces observations et met en évidence une présence des gènes *tetA(P)* et *tetB(P)* respectivement dans 86 et 19 souches de notre collection. Ces gènes codent tous deux pour des protéines d'efflux de la tétracycline, un mécanisme bien connu chez *C. perfringens*. Notre analyse génomique montre une forte prévalence des gènes codants l'antidéfensine (*mprF*) et la tétracycline : *tetA(P)* et *tetB(P)*. Cependant, comparés aux autres pathogènes alimentaires comme *S. aureus* et *Salmonella*, cette prévalence reste faible. Cette faible fréquence serait due au fait que la

collection provient uniquement des aliments. Une étude phénotypique et génotypique plus étendue impliquant des souches d'origines cliniques et environnementales permettrait d'avoir un aperçu global de la fréquence de ces gènes de résistance.

2.3.5. Profils phagiques

L'extrême variation du pan-génome obtenu par l'analyse de 146 génomes de *C. perfringens* semble être induite par le transfert horizontal des éléments génétique mobiles comme l'indique le nombre élevé des gènes uniques (33 % du pan-génome). La majorité de ces gènes codent des protéines associées aux transposases (n= 237), aux intégrases (n=61) et aux phages (n=64). Ces derniers ont été identifiés dans 73 % des génomes et jusqu'à 7 phages différents ont été détectés dans les génomes de *C. perfringens* témoignant d'une fréquence élevée d'agression par les phages. Le nombre élevé et diversifié des phages détectés peut s'expliquer également par la capacité de *C. perfringens* à infecter plusieurs hôtes et sa présence ubiquitaire dans l'environnement (Kiu et al., 2017). L'intégration des phages dans le génome est à l'origine de la diversité génomique des souches bactériennes (Knight et al., 2017). Bien que le nombre et la diversité des phages détectés dans les génomes de souches de *C. perfringens* dans notre étude soient supérieurs comparés à d'autres pathogènes comme *C. difficile* (Knight et al., 2017), ils restent cependant faibles comparés à une étude similaire réalisée sur un panel issu de souches d'origines cliniques, alimentaires, animales et environnementales (Kiu et al., 2017). Une possible protection contre les infections phagiques par des mécanismes d'immunité acquise (le système CRISPR-cas) pourrait expliquer cette différence.

2.3.6. Identification des Loci- CRISPR-Cas

Les éléments CRISPR confèrent aux bactéries une immunité adaptative contre les agressions extérieures y compris les phages (Makarova et al., 2015). Dans cette étude, nous avons caractérisé les systèmes CRISPR-Cas dans les génomes de 146 souches de *C. perfringens* isolées des aliments. Nos résultats ont permis de mettre en évidence la présence d'au moins un locus CRISPR dans 103 souches. Sur la base de la nomenclature polythétique des systèmes CRISPR-Cas (Makarova et al., 2015), le sous-type I-B représente 92 % des loci identifiés. Très peu d'études réalisées sur les loci CRISPR de *C. perfringens* sont actuellement disponibles (Kiu

et al., 2017; Lacey et al., 2018). A notre connaissance, il n'existe pas de travaux publiés sur l'occurrence de type et de sous-type de systèmes CRISPR-Cas chez *C. perfringens*. Des résultats similaires ont été obtenu avec *C. difficile* (Andersen et al., 2016). Une analyse détaillée de la distribution des loci CRISPR et l'occurrence des phages montre une corrélation négative dans les souches de notre collection. Ces résultats indiquent une immunité adaptative (active) chez ces souches et différent de ceux obtenus par Kiu et al. (2017) qui ont démontré une absence des loci-CRISPR dans 70 % (40/56) des souches de *C. perfringens* analysées. Dans notre étude, nous avons identifié entre deux et six loci CRISPR dans 64 % des génomes de notre collection, ce qui est plus élevé que le nombre (un à trois) des loci CRISPR identifiés chez d'autres bactéries pathogènes comme *Salmonella enterica subsp* (Shariat et al., 2013; Yin et al., 2013), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Yersinia* (Cady et al., 2011). Ce résultat suggère que l'espèce *C. perfringens* est soumise aux attaques phagiques que ces autres espèces.

2.4. Conclusion et perspectives

Le séquençage de génome complet est de plus en plus utilisé pour caractériser les bactéries responsables des pathologies alimentaires. L'analyse génomique de 146 souches de *C. perfringens* issues de 44 TIAC survenues en région parisienne a permis d'identifier deux clades génétiquement distincts. Un premier clade qui est composé des souches *cpe+* chromosomique, et un deuxième clade composé à la fois des souches *cpe+* plasmidique et des souches *cpe-*. La comparaison des gènes core des souches *cpe+* et *cpe-* a permis d'identifier des marqueurs spécifiques à ces deux populations. Une exploration de ces marqueurs permettra de déterminer des signatures génétiques et développer des outils rapides comme la PCR pour le typage de ces populations. L'étude phylogénomique associée aux origines alimentaires des souches a permis un regroupement des souches enterotoxinogènes isolées de la viande de volaille y compris celles impliquées dans des épisodes toxiques différents. Ces résultats suggèrent que les souches issues de la volaille possèdent des caractéristiques particulières qui peuvent être explorées et utilisées pour un suivi épidémiologique. La reconstruction du pan-génome a révélé que *C. perfringens* possède un pan-génome très diversifié causé par des échanges par transfert horizontal du mobilome. L'analyse de ce mobilome, notamment les plasmides, les phages, les gènes d'antibiorésistance et les loci-CRISPR a montré une diversité de celui-ci. La présence des gènes *mprF* (100%), *bcr* (80 %) et *tetA(P)* (61 %) codant respectivement pour une résistance aux aminosides, à la bacitracine, et une protéine d'efflux de la tétracycline dans les génomes des *C. perfringens* constitue une menace potentielle de résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement des infections associées à ce pathogène. Toutefois, une évaluation phénotypique de la résistance à ces antibiotiques reste à réaliser pour déterminer les profils du resistome. L'analyse génomique par WGS de l'extension de la collection des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC en région parisienne a permis de mettre en évidence la plasticité du pan-génome et une diversité du mobilome dans les souches enterotoxinogènes et non-enterotoxinogènes. Pour mieux comprendre la virulence associée à ces deux populations, des études expérimentales *in vitro* sur une collection représentative de cette diversité est nécessaire.

CHAPITRE 3. EFFET CYTOTOXIQUE DES SOUCHES DE *C. PERFRINGENS* ISOLEES À PARTIR DE TIAC

3.1. Contexte et objectifs

Par sa capacité à produire plus de 20 facteurs de virulence, *C. perfringens* est un pathogène connu pour être responsable des maladies intestinales à la fois chez l'Homme et chez les animaux (Petit et al., 1999). Il est notamment impliqué dans les intoxications alimentaires dans les pays industrialisés et représente la quatrième cause de TIAC en France (Afshari et al., 2016; EFSA, 2015; Brynestad et al., 1997). Comparé à d'autres pathogènes alimentaires producteurs des toxines comme *S. aureus* et *B. cereus*, le tableau clinique des TIAC à *C. perfringens* est relativement léger et n'entraîne pas d'hospitalisation (Grass et al., 2013; Vaillant et al., 2005). Par conséquent, le problème sanitaire lié aux TIAC à *C. perfringens* est probablement sous-estimé (Santé publique France, 2015). Les connaissances actuelles associent les TIAC à *C. perfringens* aux souches productrices de la CPE classées comme appartenant au toxinotype F selon la nouvelle classification de *C. perfringens* (Rood et al., 2018). Des preuves épidémiologiques et expérimentales solides existent quant à l'implication de la CPE dans l'apparition des symptômes dus aux intoxications alimentaires causés par *C. perfringens* *cpe+* (Brynestad and Granum, 2002; Freedman et al., 2016; McClane et al., 2013; Scallan et al., 2011). Il semble donc clair que les souches de toxinotype F sont responsables de la grande majorité des cas d'intoxications alimentaires (Freedman et al., 2016). Cependant, deux études ont mis en évidence des cas d'intoxications alimentaires à *C. perfringens* *cpe-* (Irikura et al., 2015; Yonogi et al., 2014) et l'implication des autres facteurs de virulence dans l'étiologie des TIAC n'est pas bien connues. De plus, la difficulté d'isoler ou de différencier les souches *cpe+* par la norme EN NF ISO 7937 représente un autre défi de caractérisation des TIAC à *C. perfringens*.

Les données épidémiologiques de notre collection de 146 souches associées à 44 TIAC survenues en région parisienne et l'analyse des profils de gènes de virulence basée sur la présence ou l'absence des gènes codants les facteurs de virulence, confirmée par une analyse BLAST sur des données de séquençage, montre la présence des souches *cpe-* comme seul potentiel pathogène mis en évidence dans 13 TIAC. Les profils de ces souches *cpe-*

montrent une présence de gènes codants les facteurs de virulence significativement plus élevée comparés à ceux des souches *cpe+* (Abdelrahim et *al.* 2019). De plus, l'inférence phylogénomique basée sur la variation du core-génome a mis en évidence que ces souches forment un cluster avec une répartition des gènes de virulence retrouvés uniquement dans ce cluster notamment les gènes *pfoA* et *nanI*.

Afin de confirmer l'implication des souches *cpe-* ou l'implication des toxines autres que la CPE dans l'étiologie des TIAC, les effets cytotoxiques et anti-inflammatoires de surnageants de cultures réalisés en phase exponentielle et stationnaire obtenus à partir d'une collection de 54 souches représentatives des TIAC et des profils toxiques ont été évalués *in vitro* sur une lignée de cellules épithéliales.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Sélection des souches et préparation des surnageants de cultures bactériennes

Une collection de 54 souches représentatives des profils de gènes de virulence obtenus lors des différentes TIAC a été sélectionnée pour la mesure de la cytotoxicité. Les surnageants bactériens ont été préparés sur des cultures de cellules végétatives en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Le protocole détaillé de la préparation des surnageants est joint en annexe 4.

3.2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire Caco-2 (ATCC® HTB-37™, Molshseim, France) est issue d'un adénocarcinome colorectal humain (Fogh et al., 1977). Ces cellules ont la capacité de se différencier spontanément pour donner à confluence des cellules entérocytaires polarisées présentant des microvillosités sur leur coté apical (Sambuy et al., 2005). Elles présentent des jonctions serrées typiques de l'épithélium intestinal, des transporteurs comme les glycoprotéine P (P-gp) et produisent de nombreuses enzymes telles des peptidases et des isomaltases ainsi que certaines enzymes du métabolisme dont les cytochromes P450 2C9 et 3A4 (Sambuy et al., 2005).

3.2.2. Entretien des cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont cultivées en flasques de 75 cm² dans un milieu MEM (Minimum Essential Medium, Gibco-Invitrogen) (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) contenant des sels de Earle et du GlutaMAX™ (Gibco-Invitrogen)) (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), supplémenté avec de la pénicilline (100 UI.ml⁻¹), de la streptomycine (100 µg.ml⁻¹) (Gibco-Invitrogen) et 1% d'acides aminés non essentiels(Gibco-Invitrogen) et 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF, Invitrogen)) (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 5% de CO₂ et à 37°C. Les cellules sont repiquées tous les 3-4 jours jusqu'à ce qu'elles atteignent environ 80 % de confluence. Après rinçage au PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco-Invitrogen) (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), le tapis cellulaire est recouvert d'un ml

de trypsine – EDTA 0,05 % (trypsine-Ethylène Diamine Tétra Acétique, Gibco-Invitrogen) (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) et la culture est remis dans l'incubateur pendant 5 minutes. Après décollement et ajout de milieu avec 10 % de SVF, les cellules sont centrifugées à 136 g pendant 5 minutes. Après comptage, elles sontensemencées à 10^6 cellules dans 15 ml de milieu complet à 10% de SVF dans une nouvelle flasque de 75 cm².

3.2.3. Le test au MTT

Le test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) permet de déterminer la cytotoxicité d'une molécule en mesurant l'activité mitochondriale. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium (MTT). En présence du substrat MTT, les sels de tétrazolium sont transformés en cristaux violets insolubles de formazan, par l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase présente dans les mitochondries (**Figure 29**). La quantité de précipité violet formé est ainsi proportionnelle à la quantité de cellules vivantes, ce qui permet de déterminer la viabilité cellulaire (Mosmann, 1983).

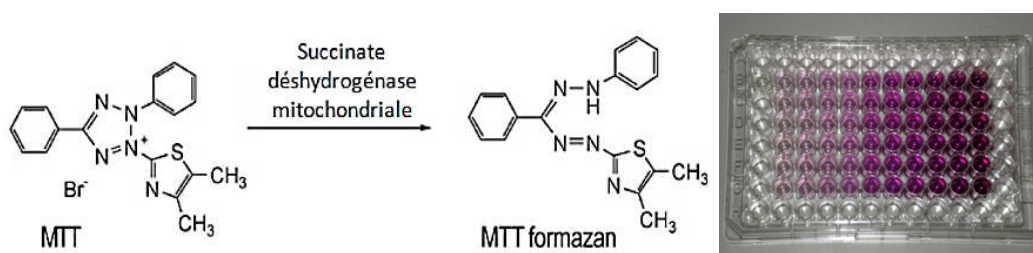


Figure 29. Principe du test au MTT

Pour réaliser le test MTT, les cellules Caco-2 sontensemencées à la densité de 20 000 cellules par puits dans des plaques de 96 puits. Après 24 h de culture, le milieu est éliminé et les différentes dilutions des surnageants de culture des souches sont mises en contact avec les cellules à raison de 100 µl/puits. Après 24 h d'incubation à 37 °C, par observation au microscope inversé, la morphologie des cellules et l'absence de cytotoxicité pour les témoins ont été vérifiés. Après avoir éliminé le milieu de traitement, 100µl de solution de MTT à 500 µg/ml a été ensuite ajouté dans chaque puits.

Après 2 h d'incubation à 37 °C, le milieu contenant le MTT a été éliminé et 100µl d'isopropanol acidifié (23 volumes d'isopropanol avec 1 volume d'HCl 1N) a été ajouté dans

chaque puit pour dissoudre les cristaux de formazan. La microplaque a été par la suite mise sous agitation jusqu'à homogénéisation.

La lecture d'absorbance a été effectuée au spectrophotomètre (Fluostar) à une longueur d'onde d'environ 570 nm.

3.2.4. Le test ELISA de dosage des cytokines inflammatoires

Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est un test de dosage immuno-enzymatique qui permet de détecter et de quantifier les complexes immuns (antigène-anticorps) (**Figure 30A**). Il a été utilisé pour des cytokines inflammatoires (IL-8 notamment). Ces dernières sont produites par les cellules épithéliales suite à la détection d'agents biologiques ou chimiques potentiellement pathogènes. Elles vont être responsables de l'activation d'autres mécanismes immunitaires provoquant une inflammation.

Le test ELISA sandwich est un test de dosage immuno-enzymatique sur support solide (**Figure 30B**). Ce test permet de détecter la présence d'antigènes dans un échantillon : les cytokines. La technique utilise deux anticorps, l'un est spécifique aux cytokines, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à l'enzyme. Ce substrat permet ainsi un suivi spectrophotométrique de la méthode à une longueur d'onde de 405 nm. Le protocole détaillé de l'analyse est décrit **figure 31** et joint à l'Annexe 5.

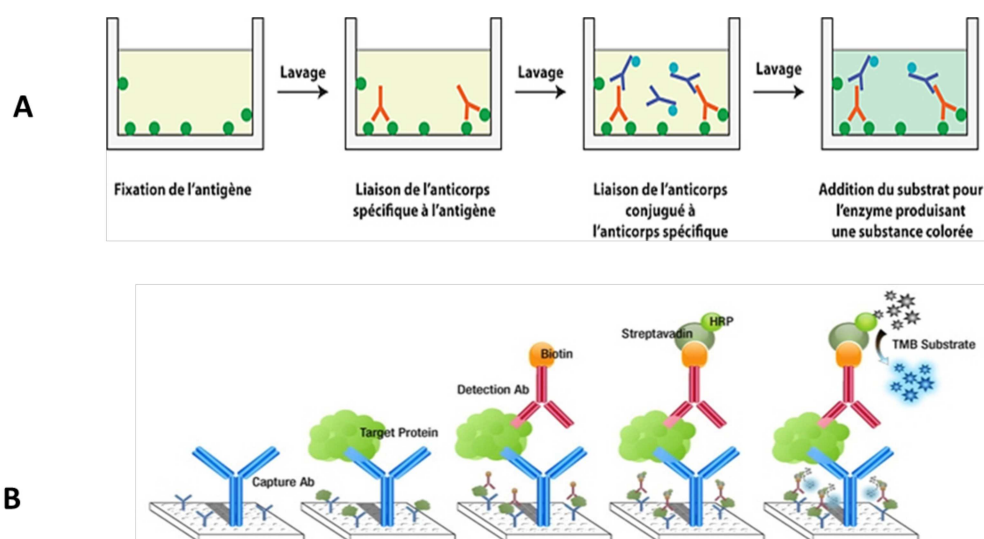


Figure 30. Principe du test ELISA (A) et du test ELISA sandwich (B)

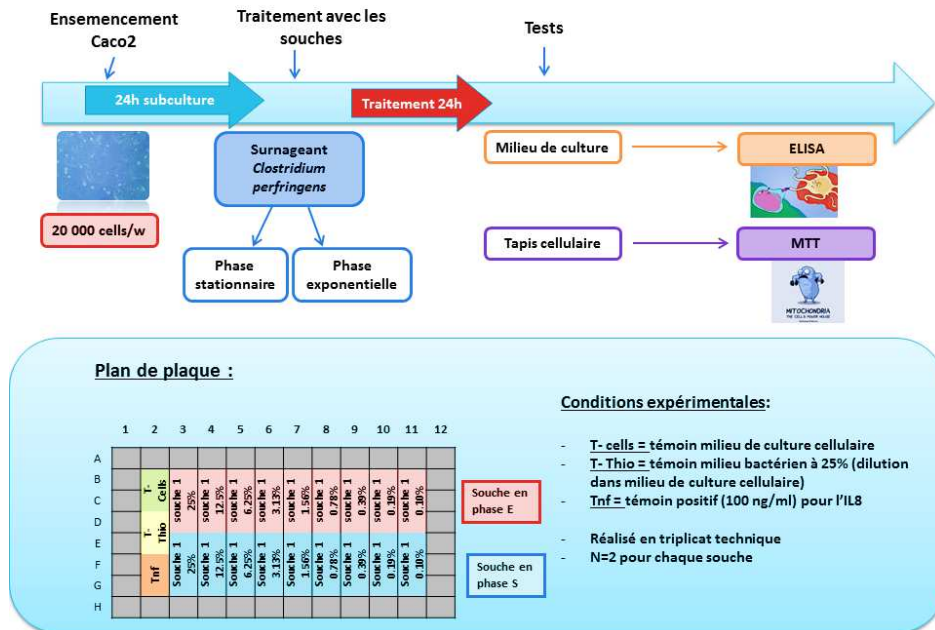


Figure 31. Schéma de différentes étapes du protocole de traitement et de l'analyse ELISA

3.2.5. Analyse du contenu cellulaire

L'analyse du contenu cellulaire est basée sur la quantification de la fluorescence dans différents compartiments cellulaires en utilisant des sondes fluorescentes ou des anticorps couplés à un fluorochrome. L'utilisation des marqueurs avec différentes longueurs d'onde d'absorption permet de mesurer différents composants cellulaires et d'observer des changements.

ArrayScan® VTI (Thermo Scientific Cellomics®), un instrument dédié à la mesure et l'analyse du contenu cellulaire en images, a été utilisé. Il intègre un microscope à fluorescence pour l'analyse des cellules fixées ou vivantes. Il est muni d'un microscope et d'optiques Carl Zeiss, d'une source d'illumination composée de 4 diodes (349 nm, 488 nm, 540 nm et 650 nm), d'une caméra CCD 12 bit refroidie et d'une suite logicielle permettant l'acquisition et l'analyse des images. Les cellules ont été cultivées en monocouche dans un format de plaque à puits multiples et traitées en présence ou en l'absence de molécules à tester. Les plaques ont été analysées dans des conditions de cellules vivantes ou fixes en utilisant le module Live Cell (Figure 32).

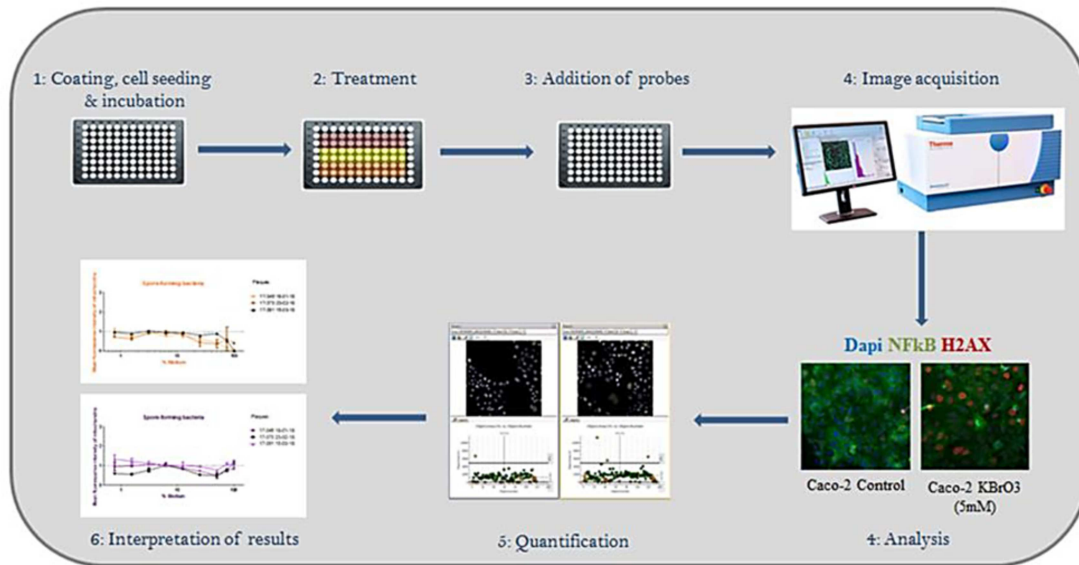


Figure 32. Procédure d'analyse sur le VTi array scan. Les cellules sont étalées sur des plaques recouvertes de collagène. Les plaques peuvent être soit fixées au formaldéhyde et marquées à l'anticorps, soit analysées sous-forme des cellules vivantes après l'ajout des sondes. L'appareil acquiert les images et le logiciel les analyse pour obtenir des données quantifiables qui sont ensuite utilisées pour interpréter le résultat.

3.2.6. Analyses des cellules vivantes

La détection et l'identification automatisées de cellules vivantes ont été réalisées par coloration nucléaire avec le colorant Hoechst 33342 fluorescent (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le potentiel membranaire mitochondrial (MMP) a été utilisé comme marqueur de la toxicité cellulaire. Afin d'évaluer l'effet du surnageant bactérien sur le MMP dans les cellules Caco-2, les cellules traitées ont été incubées avec du TMRE (tétraméthylrhodamine, ester éthylique, Thermo Fisher Scientific TM, Villebon-sur-Yvette, France), un colorant fluorescent cationique qui s'accumule dans les mitochondries actives. Une perte du MMP entraînera alors une diminution de la fluorescence de TMRE dans les cellules. Cinquante microlitre d'une solution de MEM (3X) contenant du TMRE et du Hoechst à 150 nM et 10 μ M respectivement ont été ajoutés 30 minutes avant la fin du traitement. Le milieu de traitement a été ensuite retiré et les cellules ont été lavées deux fois avec du MEM sans sérum avant de lire les plaques. L'amiodarone (Saint-Quentin-Fallavier, France) a été utilisé comme contrôle positif pour le test de TMRE (Tetramethyl Rhodamine Ester). L'amiodarone est un bloqueur non sélectif des canaux ioniques qui induit un afflux immédiat de Ca^{2+} , suivi d'une fragmentation mitochondriale et de la mort cellulaire. En raison de cette

caractéristique, il a été utilisé comme contrôle positif pour induire une perte de potentiel mitochondrial.

3.2.7. Analyses des cellules fixées

Après traitement, les plaques ont été lavées deux fois avec du PBS (solution tampon) et fixées avec du formaldéhyde à 4% (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), puis perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,2% de PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) pendant 15 minutes. Les puits ont été ensuite soumis à une étape de blocage d'une heure avec du PBS Tween-20 à 0,05% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier) additionné de 1% de Blocker™ BSA (Thermo Scientific à Villebon-sur-Yvette, France). Les ruptures de l'ADN double brin ont été détectées par la phosphorylation de l'histone H2AX à la sérine 139 (γ H2AX). Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre H2AX phosphorylé en S140 (ab 22551, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) a été utilisé pour détecter les cassures de l'ADN double brin. Les niveaux de γ H2AX ont été quantifiés à l'aide du logiciel BioApplication Arrayscan.

Pour détecter la translocation de NF- κ B, du NF- κ B p65 (Abcam, Cambridge, UK), un anti-humain polyclonal de lapin a été utilisé comme anticorps primaire. La fluorescence de NF- κ B a été quantifiée dans le noyau et le cytoplasme en utilisant le logiciel BioApplication Arrayscan. L'intensité de fluorescence moyenne du marquage cytoplasmique a été soustraite de l'intensité de fluorescence moyenne du noyau. Les valeurs positives indiquent une translocation du cytoplasme vers le noyau. Les anticorps primaires ont été dilués au 1/2000 (γ H2AX) et au 1/1000 (NF- κ B) dans du PBS Tween-20 à 0,05% additionné de 1% de BSA. Après une nuit d'incubation, les anticorps secondaires Alexa Fluor® 488 (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) et Alexa Fluor® 647 (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) dilués au 1/2000 sont ajoutés aux plaques pendant une heure. Après incubation avec des anticorps secondaires, les plaques ont été lavées deux fois avec du PBS Tween-20 à 0,05% et incubées pendant 5 minutes avec une solution de DAPI (1 μ g /ml) diluée avec du PBS Tween-20 à 0,05%. Les plaques ont été ensuite analysées via le protocole d'analyse de compartiments du logiciel BioApplication.

Le KBrO₃ (bromate de potassium) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été utilisé comme contrôle positif pour les essais de génotoxicité, car il induit des effets génotoxiques et un stress oxydatif, en provoquant des ruptures de brin d'ADN, des dommages

oxydatifs en l'ADN, des aberrations chromosomiques et des mutations géniques (Speit et al., 1999). Le TNF- α (facteur de nécrose tumorale α) (Thermo Fisher, Villebon-sur-Yvette, France) a été utilisé à 100 ng/ml pour activer la voie inflammatoire au sein des cellules afin de servir de contrôle positif pour le marquage NF-KB. Le TNF- α joue également le rôle de contrôle positif pour le marquage H2AX puisqu'il est capable d'induire des ruptures de brin (Fehsel et al., 1991; Westbrook et al., 2011).

3.2.8. Traitement des données

Des tests statistiques de type analyse de variance et le test de Dunnett ont été utilisés pour calculer la différence de niveau de toxicité. Le logiciel GraphPad Prism version 5.04 a été utilisé pour la visualisation des données.

3.3. Résultats

3.3.1. Tests de cytotoxicité

Les données sur les essais de cytotoxicité de 54 souches représentatives de notre collection après 24 h de traitement ont montré très peu de cytotoxicité pour la plupart des souches. Les résultats obtenus après 24 heures d'exposition des cellules Caco-2 aux surnageants bactériens de *C. perfringens* en phase végétative et exponentielle ont montré que six souches seulement ont induit un effet cytotoxique. L'effet cytotoxique observé était variable. Sur les six souches, deux ont montré un effet cytotoxique sévère. La souche 16SBCL624 a induit une sévère cytotoxicité en phase de croissance exponentielle à la concentration de 6,25 %, tandis que la souche 16SBCL110 a induit les mêmes effets à la même concentration en phase stationnaire (**Figure 33**).

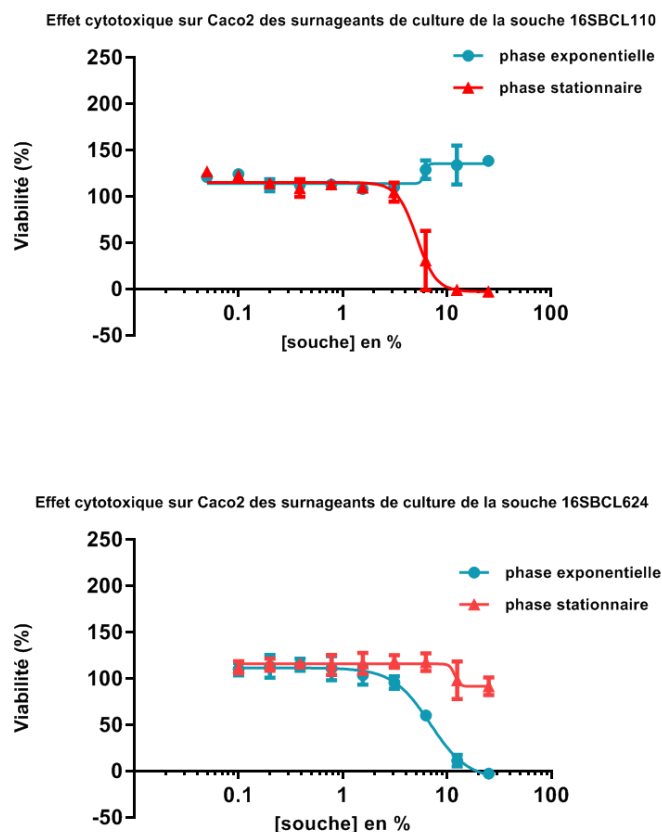


Figure 33. Cytotoxicité des souches 16SBCL110 et 16SBCL 624 après 24 heures de traitement.

Comparées au témoin négatif, les souches 16SBCL577, 16SBCL940 et 16SBCL1589 ont induit une légère cytotoxicité en phase stationnaire à la concentration de 12,5 %. La souche 16SBCL 573 a montré une cytotoxicité à une concentration de 25 % (**Figure 34**).

Les profils de gènes de virulence des souches ayant montré un effet cytotoxique sont divers. Les souches 16SBCL110 et 16SBCL577 possèdent le profil IV, les souches 16SBCL940 et 16SBCL573 appartiennent au profil V, la souche 16SBCL624 appartient au profil VI, et la souche 16SBCL1589 appartient au profil X.

Aucun effet cytotoxique sur les cellules Caco-2 n'a été observé pour les autres souches après 2 heures et 24 heures d'exposition aux surnageants des phases de croissance exponentielle et stationnaire. De même, aucun changement significatif de taille ou de l'intensité du noyau n'a été observé.

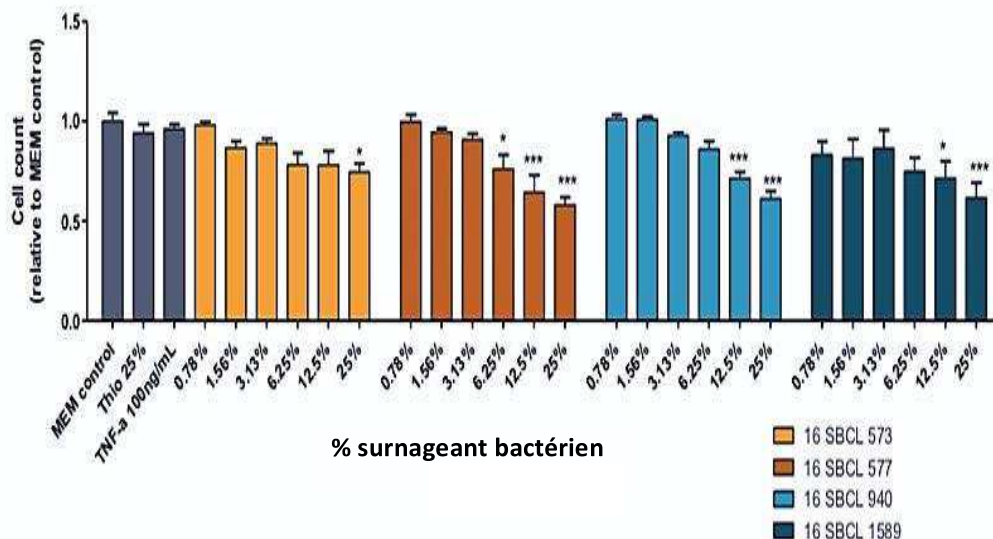


Figure 34. Cytotoxicité des souches induisant une faible cytotoxicité après 24 heures de traitement

Aucun effet cytotoxique n'a été observé pour 48 souches. Ce résultat inattendu peut être dû à une instabilité des échantillons qui ont subi plusieurs des congélation et décongélations ou à un modèle de test inapproprié. Il serait également du fait de la faible production des toxines par *C. perfringens* en milieux de culture bactérienne (Ohtani et al., 2010). Cette faible toxicité observée doit être confirmée avec des surnageants de forme sporulée.

3.3.2. Évaluation des effets inflammatoires induits par les souches de *C. perfringens* et production d'interleukine (IL-8)

Le facteur de transcription NF- κ B est un complexe protéique qui régule la transcription des gènes codants des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Sonner et al., 2010). La réponse inflammatoire induite par NF- κ B peut être médiée par des cytokines comme le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), les interleukines (IL-1, IL-6) et des chémokines comme l'interleukine 8 (IL-8) (Fehsel et al., 1991). La translocation de NF- κ B des cellules Caco-2 traitées par les surnageants de *C. perfringens* a été quantifiée en mesurant la différence de fluorescence dans les deux compartiments cellulaire à savoir le noyau et le cytoplasme. La production de l'interleukine a été quantifiée par ELISA type sandwich.

Mise à part neuf souches, les souches testées induisent la production de l'IL-8 au cours des deux phases de croissance. Cependant, l'induction de la production de l'IL-8 est beaucoup plus importante en phase de croissance stationnaire avec une concentration de 6,25 %. Les résultats sur l'ensemble de collection sont synthétisés dans la **Figure 35**.

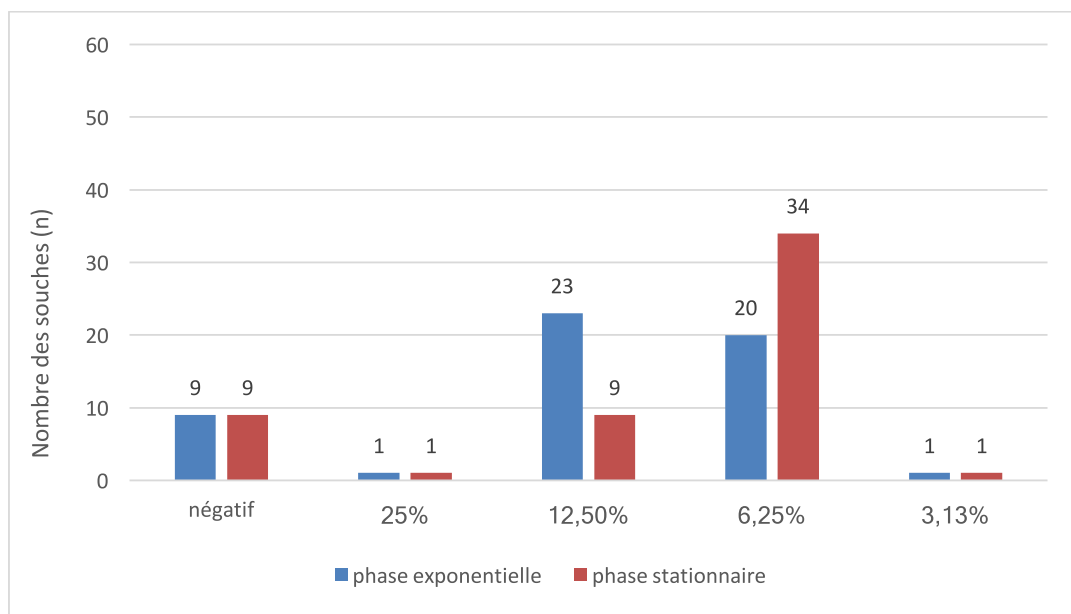


Figure 35. Nombre de souches de *C. perfringens* et concentrations de surnageant de culture induisant la production de l'IL-8

Une forte induction de la production d'IL-8 à partir d'une concentration de 3,12 % a été observée pour les souches 17SBCL85 en phase stationnaire de croissance et pour la souche cytotoxique (Figure 33A) 16BCL624 en phase exponentielle de croissance (**Figure 36**).

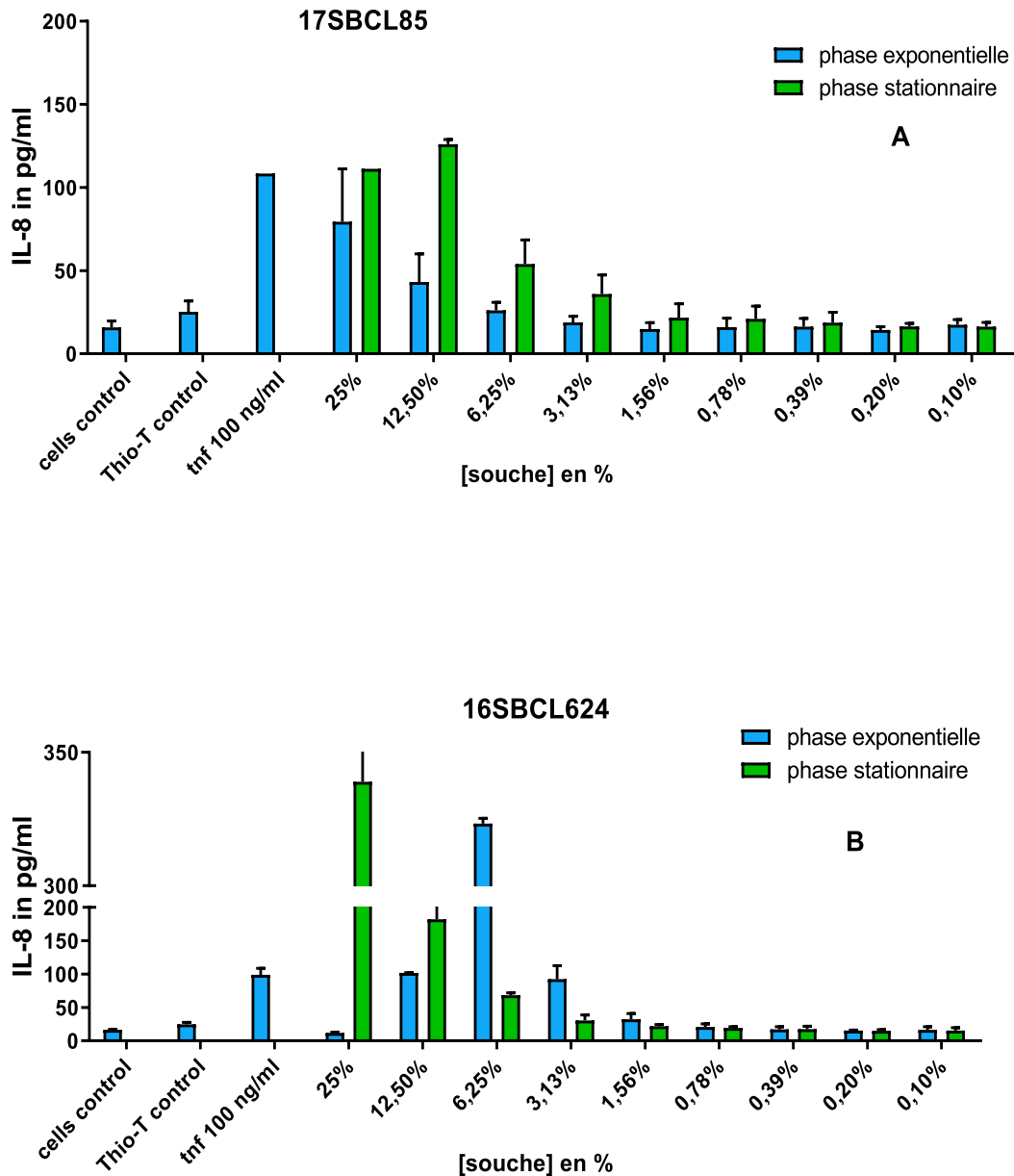


Figure 36. Souches induisant une forte production d'IL8 à partir de 3,12 %.(A) pour la souche 17SBCL85 et (B) pour la souche 16SBCL624.

3.4. Discussion

Les résultats de l'analyse de cytotoxicité réalisées à partir des surnageants de culture de cellules végétatives de *C. perfringens* ont permis d'identifier des souches capables d'induire des effets cytotoxiques après 24 heures d'exposition aux cellules Caco-2. Des études précédentes réalisées avec les surnageants des souches SM101 et F4969 avaient démontré que l'expression de la CPE produite pendant la phase de sporulation de *C. perfringens* était nécessaire et suffisante pour induire des lésions histopathologiques (Sarker et al., 2000). Nos résultats indiquent clairement que des effets cytotoxiques peuvent être également induits pendant la phase de croissance végétative. Il s'agit d'un résultat important suggérant que des éléments toxiques autres que la CPE sont produits par certaines souches de *C. perfringens*. Des résultats similaires ont été obtenus par Yasugi et al. (2015) sur une souche de *C. perfringens* dont le gène *cpe* a été muté. Toutefois, les résultats dans notre étude sont surprenants du fait que seules 3 souches (16SBCL110, 16SBCL624 et 16SBCL1589) ont induit un effet cytotoxique, alors que toutes les souches ont été isolées d'aliments impliqués dans des TIAC. Ceci suggère que le test ou les conditions de réalisation ne sont pas adaptés à l'évaluation de la pathogénécité des souches associées aux TIAC.

Bien qu'elles soient *cpe+*, les souches 16SBCL577 et 16SBCL940 n'induisent qu'une légère cytotoxicité à une concentration de 25 %. Il est intéressant de constater que la souche 16SBCL1589 induit également un léger effet cytotoxique, moins conséquent que les deux souches *cpe+* citées précédemment, alors qu'elle est *cpe-* et donc ne produit pas la CPE. Mise à part la souche 16SBCL624, les souches ayant montré un effet cytotoxique possèdent toutes le gène *nagH*. Ces résultats appuient notre hypothèse selon laquelle *nagH* aurait un effet cytotoxique potentiel.

Il a été démontré que les souches de *C. perfringens* déclenchent une réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales primaires et dans le modèle de myonécrose par l'induction de l'expression de l'ARNm de l'IL-6, l'IL-8 et le NF-κB (Guo et al., 2015; Oda et al., 2008). Nos résultats démontrent que certaines souches impliquées dans les intoxications alimentaires sont capables également d'induire ces effets.

Globalement, nos résultats indiquent un effet inflammatoire prononcé par la production d'IL-8 pendant la phase stationnaire de croissance. L'absence de production d'IL-

8 dans les cellules Caco-2 traitées par les surnageants de la souche 16SBCL110 est probablement attribuable à l'effet cytotoxique. En effet, une cytotoxicité significative a été observée en phase stationnaire après 24 heures de traitement pour les concentrations de 6,25 et 3,12 %.

Enfin, il est intéressant de noter que des études ont mis en évidence l'action synergétique des toxines α et θ dans la production de l'IL-8 (Awad et al., 2001). Les souches testées possédaient toutes le gène *cpa* codant la toxine α . Cependant, seules 30 souches étaient positives au gène *pfoA* codant la toxine θ . Nos résultats ne montrent pas cette corrélation significative entre la production de l'IL-8 et la présence des gènes *cpa* et *pfoA*.

3.5. Conclusion et perspectives

Les résultats issus de l'analyse de cytotoxicité ont permis de mettre en évidence que des cellules de *C. perfringens* sous forme végétative sont capables d'induire des effets cytotoxiques sévères dans un modèle *in vitro* sur des cellules Caco-2. Ces effets cytotoxiques ont été induits par des souches *cpe+* (cytotoxicité sévère à 6,25%, cytotoxicité modérée à 12,5 %) et une souche *cpe-* (cytotoxicité modérée à 12,5 %). La CPE étant produite uniquement en phase de sporulation, les effets observés résultent probablement de l'action d'une autre toxine ou de la synergie de plusieurs toxines et facteurs de virulence. Néanmoins, la plupart des souches de *C. perfringens* impliquées dans des épisodes toxiques n'ont pas montré d'effets cytotoxiques. Cette différence peut être due à la congélation et décongélation des surnageants, car nous ne disposons pas d'informations sur la stabilité des toxines autre que les toxines majeures. Des voies telles que l'activation de NF- κ B semblent être impliquées. Il serait donc intéressant de tester d'autres marqueurs comme par exemple le stress oxydatif et le flux de calcium et des tests mettant en évidence la génotoxicité. Des essais sur des surnageants de culture en condition de sporulation sont nécessaires pour confirmer l'absence de cytotoxicité des souches. De plus, le modèle des cellules Caco-2, cellules robustes, dérivées d'un adénocarcinome, ne reflète pas la complexité du système intestinal, il serait donc intéressant de tester d'autres modèles cellulaires et éventuellement sur la base d'un ensemble de données consolidées et de tester –sur un modèle vivant l'impact des souches les plus toxigènes.

III – CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de ces travaux de thèse était de caractériser une collection de 146 souches de *C. perfringens* isolées d'aliments impliqués dans 44 TIAC survenues en région parisienne entre 2013 et 2018 prenant en compte tous les facteurs de virulence actuellement connus. Une approche PCR en temps réel basée sur la détection de 17 gènes codants 15 facteurs de virulence a été développée et validée à cet effet.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer 15 profils de gènes de virulence différents indiquant une grande diversité des souches de *C. perfringens*. Pour la première fois, une hétérogénéité des profils de gènes de virulence a été mise en évidence dans les souches isolées lors d'une même TIAC. De plus, dans certaines TIAC où *C. perfringens* est l'unique pathogène identifié dans l'aliment suspecté, les souches isolées étaient dépourvues du gène *cpe*. Ces résultats indiquent que soit la méthode n'a pas permis l'isolement de l'agent pathogène, soit que l'entérotoxine n'est pas la seule toxine responsable de l'apparition des symptômes des TIAC causées par *C. perfringens*. Il semble donc intéressant de mener lors de la caractérisation des TIAC l'analyse des profils de gènes de virulence en complément de la norme existante pour mieux apprécier la diversité des souches isolées lors des épisodes toxiques.

L'approche PCR basée sur la détection de 17 gènes utilisée est la seule approche aussi rapide et fiable qui permet d'obtenir un profil en moins de 7 heures. D'où l'intérêt de développer des systèmes PCR ciblant la totalité des gènes de virulence décrits afin de disposer d'un outil d'analyse simple, utilisable par les DDPP (Directions Départementales de la Protection des Populations). L'élaboration d'une biopuce PCR à haut débit pourrait également être envisagée à moyen terme pour avoir une vue complète du potentiel de virulence. L'intérêt d'un tel outil devra être mesuré en terme de coût et d'information obtenue avec la réalisation systématique du séquençage complet des souches isolées des aliments contaminés à l'origine de TIAC.

Le second objectif de mes travaux était d'approfondir la connaissance épidémiologique entre les souches impliquées dans les TIAC. Une reconstruction phylogénomique basée sur les SNP du core-génome a donc été déduite à partir tout d'abord des séquences d'une collection représentative de 58 souches isolées de diverses matrices alimentaires (viandes, poissons, végétaux ...). L'analyse a permis d'identifier deux clades génétiquement distincts composés d'une part des souches *cpe+* chromosomiques et d'autre

part des souches *cpe+* plasmidiques et *cpe-*. Ainsi, ces résultats nous amènent à émettre l'hypothèse d'une adaptation à une niche écologique de ces deux clades. Elle a permis également de mettre en évidence des souches isolées lors d'une même TIAC avec des profils de gènes de virulence identiques mais génétiquement distinctes au niveau de leur core-génome, montrant ainsi l'intérêt du séquençage du génome complet pour distinguer des souches de *C. perfringens* et la nécessité d'élargir l'étude phylogénomique à toute notre collection pour en évaluer la diversité.

L'étude phylogénomique core-génome SNP et BLAST sur l'ensemble de la collection a révélé un lien entre les souches *cpe+* isolées des aliments à base de viande de volaille suggérant l'existence probable de marqueurs spécifiques pour les souches isolées de cette matrice qui pourraient permettre leur suivi épidémiologique. La liste des marqueurs et de leurs fonctions doit être définie et pourrait être utilisé pour l'attribution des sources des TIAC causées par des aliments à base de viande de volaille.

Notre étude s'est poursuivie ensuite par une analyse de génomique comparative. Les résultats de la construction pan-génomique ont révélé que *C. perfringens* possède un pan-génome ouvert et largement diversifié faisant de ce *pathogène* le microorganisme possédant le pan-génome le plus diversifié actuellement identifié. Cette observation a été confirmée par l'analyse fonctionnelle qui a montré la présence de gènes codants pour des éléments génétiques mobiles ou mobilome notamment des intégrases, des transposases, et des phages.

La caractérisation de la collection en fonction du mobilome a tout d'abord mis en évidence la grande diversité de plasmides présents chez les souches de *C. perfringens*, en particulier ceux porteurs du gène *cpe* ou des gènes codant la résistance aux antibiotiques comme les aminosides, la tétracycline et la bacitracine. La présence de ces plasmides portant des gènes de résistance aux antibiotiques constitue une source importante de dissémination de ces gènes entre les souches de *C. perfringens*. Des tests phénotypiques sont nécessaires pour confirmer l'expression de ces résistances potentielles mais également de l'entérotoxine pour confirmer la virulence des souches.

L'analyse du mobilome a également montré la grande diversité de phages présents dans le génome de *C. perfringens* puisque 16 phages différents, spécifiques à *C. perfringens* ou provenant d'autres genres bactériens comme *Bacillus*, *Staphylococcus* ou *Enterococcus*, ont été détectés dans les génomes de notre collection avec un maximum de 7 phages présents dans une même souche. Pour tenter d'expliquer cette diversité phagique, une recherche des

loci CRISPR a été effectuée et a permis de montrer la forte prévalence du sous-type I-B. Une forte présence (jusqu'à 6 loci) a été mise en évidence dans les génomes dépourvus des séquences de phages. L'analyse des gènes codants les protéines *Cas* nécessaires au fonctionnement des systèmes CRISPR a permis d'identifier un groupe de gènes *Cas* complet suggérant des loci CRISPR fonctionnel. Nos résultats ont donc permis d'établir une relation négative entre la présence des loci CRISPR et les séquences phagiques dans les génomes de *C. perfringens*.

Ainsi, la diversité pan-génomiques des souches de *C. perfringens* isolées des aliments impliqués dans les TIAC s'explique essentiellement par des événements de transferts horizontaux d'éléments génétiques entre les souches issues de différents biotopes conduisant à un core-génome très réduit. Néanmoins, malgré son faible nombre de gènes (1033 sur un total de 16310 gènes), une comparaison des core gènes a permis d'identifier des marqueurs spécifiques aux souches *cpe+* et *cpe-*. Un jeu de données plus conséquent composé de souches issues d'origines alimentaires animales, environnementales et humaines provenant de différentes zones géographiques voire de différents pays serait intéressant pour confirmer et affiner ces marqueurs spécifiques afin d'identifier des groupes de gènes associés ou favorisant le maintien du gène codant l'entérotoxine majeure CPE dans le génome de *C. perfringens*. La disponibilité d'une telle base de données génomiques aiderait également à identifier des signatures génomiques permettant la caractérisation des souches impliquées dans les TIAC. Enfin, il serait intéressant de développer un pipeline bioinformatique permettant à partir du séquençage du génome entier d'obtenir de manière automatisée toutes les données concernant les gènes connus de virulence, le mobilome et le typage des souches de *C. perfringens* impliquées dans des TIAC afin d'améliorer la surveillance et d'approfondir notre connaissance de ce germe afin, à terme, d'évaluer le risque lié à ce pathogène qui est la quatrième cause de TIAC en France et en Europe.

Enfin, le troisième objectif de mes travaux de thèse était d'explorer la virulence des souches de *C. perfringens* isolées des aliments impliquées dans les TIAC en déterminant leurs effets cytotoxiques sur un modèle *in vitro* de lignée cellulaire Caco-2.

Cette étude réalisée en collaboration avec l'Anses de Fougères sur des surnageants des cellules végétatives a mis en évidence une cytotoxicité sévère pour un nombre limité de souches *cpe+* et modérée pour une souche *cpe-*. Des réponses anti-inflammatoires ont été observées pour la plupart des surnageants préparés à partir de souches cultivées en phase

stationnaire de croissance. Bien que des effets cytotoxiques sévères aient été obtenus dans deux souches, très peu de cytotoxicité dans la collection des souches représentatives testées.. Il serait donc intéressant de tester plusieurs réplicats pour déterminer les seuils significatifs de cytotoxicité. Il serait indispensable également de tester les mêmes souches en condition de sporulation pour en particulier tester l'effet cytotoxique des surnageants dû à la production de l'entérotoxine pendant cette phase. Les cellules Caco-2 sont des cellules robustes, il serait intéressant de tester d'autres lignées cellulaires voire d'autres marqueurs cytotoxiques. Ces analyses actuellement en cours dans le cadre d'un projet européen (EJP-One health, Tox-detect) qui permettront de corrélérer la virulence des souches avec leur profils toxinique

IV – VALORISATION

1. PUBLICATION

Mahamat Abdelrahim A, Radomski N, Delannoy S, Djellal S, Le Négrate M, Hadjab K, Fach P, Hennekinne J-A, Mistou M-Y and Firmesse O (2019). **Large-Scale Genomic Analyses and Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Implicated in Foodborne Outbreaks in France.** *Front. Microbiol.* 10:777. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00777>

2. COMMUNICATIONS ORALES

Abdelrahim Abakabir Mahamat. **Exploration de la diversité génétique et du profil toxique d'une collection de *Clostridium perfringens* d'origine alimentaire en vue de caractériser des souches issues des toxi-infections alimentaires collectives en France.** Séminaire Département MIC, 22 mai 2017, Anses, Maisons-Alfort, France.

Abdelrahim Abakabir Mahamat. **Evaluation of toxinic and genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from food poisoning outbreaks in France.** To Ba Food conférence, 9 novembre 2017, Turin, Italie.

Abdelrahim Abakabir Mahamat. **Toxinic and genomic characterization of *Clostridium perfringens* isolated from food poisoning outbreaks in France.** Congrès BSPIT, 27 mars 2018, AgroParisTech, Paris, France.

3. COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Abdelrahim Abakabir, Agnès Chamoin, Michel-Yves Mistou, Jacques-Antoine Hennekinne and Olivier Firmesse. **Evaluation of toxinic and genetic diversity of a *Clostridium perfringens* library from different origins to characterize food poisoning outbreaks in France.** Journée des doctorants et des post-doctorants, 6 octobre 2016, Anses, Maisons-Alfort, France.

Abdelrahim Abakabir, Sofia Djellal, Marylène Le Négrate, Michel-Yves Mistou, Jacques-Antoine Hennekinne and Olivier Firmesse. **Toxinic profiles of *Clostridium perfringens* isolated from food poisoning outbreaks in France.** Journée des doctorants de l'Ecole Doctorale ABIES, 26 avril 2017, AgroParisTech, Paris, France.

4. ENCADREMENT

Stagiaire Master 2 Microbiologie et génie biologique. **Profils toxiques et typage de souches de *Clostridium perfringens* impliquées dans les toxi-infections alimentaires collectives en France.** Université Paris Diderot, *février 2017-juillet 2017.*

Stagiaire Master 2 STA2E Biologie Intégrative (OMICs). **Exploration de la diversité génétique de souches de *Clostridium perfringens* impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives en Ile-de-France par séquençage de génomes entiers.** Université Paris Est-Créteil – Val de Marne (UPEC), *février 2018-juillet 2018.*

V – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathog. 8, e1002776.
- Adams, V., Han, X., Lyras, D., Rood, J.I., 2018. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. Plasmid.
- Adams, V., Li, J., Wisniewski, J.A., Uzal, F.A., Moore, R.J., McClane, B.A., Rood, J.I., 2015. Virulence plasmids of spore-forming bacteria, in: Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery. American Society of Microbiology, pp. 533–557.
- Afshari, A., Jamshidi, A., Razmyar, J., Rad, M., 2016. Genomic diversity of *Clostridium perfringens* strains isolated from food and human sources. Iran. J. Vet. Res. 17, 160–164.
- Agi Deguchi, Kazuaki Miyamoto, Tomomi Kuwahara, Yasuhiro Miki, Ikuko Kaneko, Jihong Li, Bruce A. McClane, Shigeru Akimoto, 2009. Genetic Characterization of Type A Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Strains. PLoS One 4(5): e5598.
- Aktories, K., Just, I., 2013. Bacterial protein toxins. Springer Science & Business Media, 700p.
- Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschläger, N., Frey, J., Miserez, R., Abril, C., 2008. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. Vet. Microbiol. 127, 179–185.
- Al-Hinai, M.A., Jones, S.W., Papoutsakis, E.T., 2015. The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 19–37.
- Alouf, J.E., 2003. Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. Folia Microbiol. (Praha) 48, 5.
- Altermann, E., 2012. Tracing Lifestyle Adaptation in Prokaryotic Genomes. Front. Microbiol. 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00048>.
- Amimoto, K., Noro, T., Oishi, E., Shimizu, M., 2007. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. Microbiology 153, 1198–1206. doi.org/10.1099/mic.0.2006/002287-0.
- Andersen, J.M., Shoup, M., Robinson, C., Britton, R., Olsen, K.E., Barrangou, R., 2016. CRISPR diversity and microevolution in *Clostridium difficile*. Genome Biol. Evol. 8, 2841–2855.
- Anonymous, 2005. NF EN ISO 7937 - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* - Technique par comptage des colonies, 11p.
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S., 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 44, W16-21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>.
- Ashton, F., 1990. Multilocus enzyme electrophoresis – Application to the study of meningococcal meningitis and listeriosis. Can. J. Infect. Dis. 1, 146–148.

- Autheman, D., Wyder, M., Popoff, M., D'Herde, K., Christen, S., Posthaus, H., 2013. *Clostridium perfringens* Beta-Toxin Induces Necrostatin-Inhibitable, Calpain-Dependent Necrosis in Primary Porcine Endothelial Cells. PLOS ONE 8, e64644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064644>.
- Awad, M.M., Ellemor, D.M., Boyd, R.L., Emmins, J.J., Rood, J.I., 2001. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. Infect. Immun. 69, 7904–7910. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7904-7910.2001>.
- Awad, M.M., Ellemor, D.M., Bryant, A.E., Matsushita, O., Boyd, R.L., Stevens, D.L., Emmins, J.J., Rood, J.I., 2000. Construction and virulence testing of a collagenase mutant of *Clostridium perfringens*. Microb. Pathog. 28, 107–117.
- Bailey, M., 2013. The development and use of multiplex PCR protocols for the detection of *Clostridium perfringens* toxin encoding genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *ia*, *cpe*, *netB*, and *tpeL* PhD Thesis 81p.
- Bailey, M.A., Macklin, K.S., Krehling, J.T., 2013. Use of a Multiplex PCR for the Detection of Toxin-Encoding Genes *netB* and *tpeL* in Strains of *Clostridium perfringens*. ISRN Vet. Sci. 2013.
- Bannam, T.L., Teng, W.L., Bulach, D., Lyras, D., Rood, J.I., 2006. Functional Identification of Conjugation and Replication Regions of the Tetracycline Resistance Plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 188, 4942–4951. <https://doi.org/10.1128/JB.00298-06>.
- Bannam, T.L., Yan, X.-X., Harrison, P.F., Seemann, T., Keyburn, A.L., Stubenrauch, C., Weeramantri, L.H., Cheung, J.K., McClane, B.A., Boyce, J.D., Moore, R.J., Rood, J.I., 2011. Necrotic Enteritis-Derived *Clostridium perfringens* Strain with Three Closely Related Independently Conjugative Toxin and Antibiotic Resistance Plasmids. mBio 2, e00190-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00190-11>
- Barth, H., Ernst, K., 2016. Chaperones and ADP-Ribosylating Bacterial Toxins. Microb. Toxins 1–22.
- Barth, H., Stiles, B.G., 2008. Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. Curr. Med. Chem. 15, 459–469.
- Bassler, B.L., 2002. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. Cell 109, 421–424.
- Ba-Thein, W., Lyrstis, M., Ohtani, K., Nisbet, I.T., Hayashi, H., Rood, J.I., Shimizu, T., 1996. The *virR/virS* locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 178, 2514–2520.
- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol. 100, 11–16.
- Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J., 2014. Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Health Sciences.
- Billington, S.J., Wieckowski, E.U., Sarker, M.R., Bueschel, D., Songer, J.G., McClane, B.A., 1998. *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. Infect. Immun. 66, 4531–4536.
- Boehr, D.D., Thompson, P.R., Wright, G.D., 2001. Molecular Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Kinase APH (3')-IIIa. Roles of conserved active site residues. J. Biol. Chem. 276, 23929–23936.

- Bokori-Brown, M., Savva, C.G., Fernandes da Costa, S.P., Naylor, C.E., Basak, A.K., Titball, R.W., 2011. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.* 278, 4589–4601.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M.-F., Lió, P., Crescenzi, P., Fani, R., Fondi, M., 2015. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. *Bioinformatics* 31, 2443–2451.
- Bosi, E., Monk, J.M., Aziz, R.K., Fondi, M., Nizet, V., Palsson, B.Ø., 2016. Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E3801–E3809.
- Brazier, J.S., Duerden, B.I., Hall, V., Salmon, J.E., Hood, J., Brett, M.M., McLauchlin, J., George, R.C., 2002. Isolation and identification of *Clostridium* spp. from infections associated with the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team. *J. Med. Microbiol.* 51, 985–989.
- Brynstad, S., Granum, P.E., 2002. *C. perfringens* and foodborne infections. *Meml. Issue Gordon Stewart* 74, 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00680-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00680-8)
- Brynstad, S., Synstad, B., Granum, P.E., 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology* 143, 2109–2115.
- Bushnell, B., 2014. BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner. *Conference : BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner*.
- Cady, K.C., White, A.S., Hammond, J.H., Abendroth, M.D., Karthikeyan, R.S.G., Lalitha, P., Zegans, M.E., O'Toole, G.A., 2011. Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiology* 157, 430–437.
- Canard, B., Saint-Joanis, B., Cole, S.T., 1992. Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* 6, 1421–1429.
- Canchaya, C., Fournous, G., Brüssow, H., 2004. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol. Microbiol.* 53, 9–18.
- Cavalcanti, M.T.H., Porto, T., Porto, A.L.F., Brandi, I.V., Filho, L., De, J.L., Pessoa Junior, A., 2004. Large scale purification of *C. perfringens* toxins: a review. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 40, 151–164.
- Cerdá, P., Goñi, P., Millán, L., Rubio, C., Gómez-Lus, R., 2007. Detection of the aminoglycosidestreptothricin resistance gene cluster ant (6)-sat4-aph (3')-III in commensal viridans group streptococci. *Int. Microbiol.* 10, 57–60.
- Chalmers, G., Bruce, H.L., Hunter, D.B., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R., Jiang, Y.-F., Prescott, J.F., Boerlin, P., 2008. Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3957–3964. <https://doi.org/10.1128/JCM.01548-08>

- Chen, J., Ma, M., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2014. Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut Microbes* 5, 96–107. <https://doi.org/10.4161/gmic.26419>
- Chiarezza, M., Lyras, D., Pidot, S.J., Flores-Díaz, M., Awad, M.M., Kennedy, C.L., Cordner, L.M., Phumoonna, T., Poon, R., Hughes, M.L., 2009. The NanI and NanJ sialidases of *Clostridium perfringens* are not essential for virulence. *Infect. Immun.* 77, 4421–4428.
- Chitayat, S., Adams, J.J., Furness, H.S., Bayer, E.A., Smith, S.P., 2008. The solution structure of the C-terminal modular pair from *Clostridium perfringens* μ -toxin reveals a noncellulosomal dockerin module. *J. Mol. Biol.* 381, 1202–1212.
- Chon, J.-W., Park, J.-S., Hyeon, J.-Y., Park, C., Song, K.-Y., Hong, K.-W., Hwang, I.-G., Kwak, H.-S., Seo, K.-H., 2012. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 530–534.
- Cole, J.N., Nizet, V., 2016. Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses. *Microbiol Spectr* 4. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0006-2015.
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A., 1994. The phylogeny of the genus *C.*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812–826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
- Community), E. (European, 2003. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. OJ 325, 31–40.
- Connan, C., Popoff, M.R., 2015. Two-component systems and toxinogenesis regulation in *Clostridium botulinum*. *Res. Microbiol.* 166, 332–343.
- Consortium, I.H.G.S., 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931.
- Cortezzo, D.E., Setlow, B., Setlow, P., 2004. Analysis of the action of compounds that inhibit the germination of spores of *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* 96, 725–741.
- Coursodon, C.F., Glock, R.D., Moore, K.L., Cooper, K.K., Songer, J.G., 2012. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe* 18, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.001>
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E.P.C., Vergnaud, G., Gautheret, D., Pourcel, C., 2018. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res.* 46, W246–W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
- Davies, A.H., Roberts, A.K., Shone, C.C., Acharya, K.R., 2011. Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins. *Biochem. J.* 436, 517–526.
- de Jong, A.E.I., Beumer, R.R., Rombouts, F.M., 2002. Optimizing sporulation of *Clostridium perfringens*. *J. Food Prot.* 65, 1457–1462.

- Delannoy, S., Beutin, L., Burgos, Y., Fach, P., 2012. Specific detection of enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 strains using the CRISPR locus as target for a diagnostic real-time PCR. J. Clin. Microbiol. JCM-01656.
- Deveau, H., Garneau, J.E., Moineau, S., 2010. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. Annu. Rev. Microbiol. 64, 475–493.
- Diab, S.S., Uzal, F.A., Songer, J.G., Prescott, J.F., Popoff, M.R., 2016. Diseases Produced by *Clostridium perfringens* Type C. Clostridial Dis. Anim. 143155.
- Santé publique France, 2015, Données de la déclaration obligatoire de TIAC Santé Publique France - 11p.
- Dorca-Arévalo, J., Pauillac, S., Díaz-Hidalgo, L., Martín-Satué, M., Popoff, M.R., Blasi, J., 2014. Correlation between in vitro cytotoxicity and in vivo lethal activity in mice of epsilon toxin mutants from *Clostridium perfringens*. PloS One 9, e102417.
- Dornbusch, K., Nord, C.-E., Dahlbäck, A., 1975. Antibiotic susceptibility of *C. species* isolated from human infections. Scand. J. Infect. Dis. 7, 127–134.
- Dupuy, B., Daube, G., Popoff, M.R., Cole, S.T., 1997. *Clostridium perfringens* urease genes are plasmid borne. Infect. Immun. 65, 2313–2320.
- Dziejman, M., Mekalanos, J.J., 1995. Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors, in: Two-Component Signal Transduction. American Society of Microbiology, pp. 305–317.
- Ernst, R.K., Guina, T., Miller, S.I., 2001. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. Microbes Infect. 3, 1327–1334.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J. 14. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- European Food Safety Authority, 2015. The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J. 13.
- Fach, P., Popoff, M.R., 1997. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4232–4236.
- Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V., Kolb, H., 1991. Analysis of TNF alpha-induced DNA strand breaks at the single cell level. Am. J. Pathol. 139, 251.
- Felten, A., Vila Nova, M., Durimel, K., Guillier, L., Mistou, M.-Y., Radomski, N., 2017. First gene-ontology enrichment analysis based on bacterial coregenome variants: insights into adaptations of *Salmonella* serovars to mammalian- and avian-hosts. BMC Microbiol. 17. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1132-1>
- Ficko-Blean, E., Boraston, A.B., 2006. The interaction of a carbohydrate-binding module from a *C. perfringens* N-acetyl- β -hexosaminidase with its carbohydrate receptor. J. Biol. Chem. 281, 37748–37757.

- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., 1977. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221–226. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>
- Freedman, J.C., Shrestha, A., McClane, B.A., 2016. *C. perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins* 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>
- Freedman, J.C., Theoret, J.R., Wisniewski, J.A., Uzal, F.A., Rood, J.I., McClane, B.A., 2015. *C. perfringens* type A–E toxin plasmids. *Res. Microbiol.* 166, 264–279.
- Friedman, M., Buick, R., Elliott, C.T., 2004. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* 67, 1774–1778.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722.
- Genisyuerk, S., Papatheodorou, P., Guttenberg, G., Schubert, R., Benz, R., Aktories, K., 2011. Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. *Mol. Microbiol.* 79, 1643–1654.
- Georgiades, K., Merhej, V., El Karkouri, K., Raoult, D., Pontarotti, P., 2011. Gene gain and loss events in *Rickettsia* and *Orientia* species. *Biol. Direct* 6, 6.
- Gholamiandehkordi, A., Eeckhaut, V., Lanckriet, A., Timbermont, L., Bjerrum, L., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., 2009. Antimicrobial resistance in *C. perfringens* isolates from broilers in Belgium. *Vet. Res. Commun.* 33, 1031.
- Gibert, M., Jolivet-Reynaud, C., Popoff, M.R., Jolivet-Renaud, C., 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203, 65–73.
- Gibert, M., Petit, L., Raffestin, S., Okabe, A., Popoff, M.R., 2000. *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infect. Immun.* 68, 3848–3853.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80, 1921–1943.
- Gohari, I.M., Parreira, V.R., Nowell, V.J., Nicholson, V.M., Oliphant, K., Prescott, J.F., 2015. A Novel Pore-Forming Toxin in Type A *Clostridium perfringens* Is Associated with Both Fatal Canine Hemorrhagic Gastroenteritis and Fatal Foal Necrotizing Enterocolitis. *PLOS ONE* 10, e0122684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122684>
- Goossens, E., Valgaeren, B.R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P.R., Van Immerseel, F., 2018. Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Vet. Res.* 48, 9. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0413-x>
- Goossens, E., Valgaeren, B.R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P.R., Van Immerseel, F., 2017. Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Vet. Res.* 48, 9. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0413-x>

- Gormley, F.J., Little, C.L., Rawal, N., Gillespie, I.A., Lebaigue, S., Adak, G.K., 2011. A 17-year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992–2008). *Epidemiol. Infect.* 139, 688–699.
- Gould, D., Kraa, E., Dalton, C.B., Givney, R., Gregory, J., Stafford, R.J., Kirk, M.D., 2004. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 28, 211.
- Grass, J.E., Gould, L.H., Mahon, B.E., 2013. Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 131–136. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1316>
- Grass, J.E., Gould, L.H., Mahon, B.E., 2013c. Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 131–136. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1316>
- Greco, A., Ho, J.G., Lin, S.-J., Palcic, M.M., Rupnik, M., Ng, K.K., 2006. Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 460.
- Guernet, A., Grumolato, L., 2017. CRISPR/Cas9 editing of the genome for cancer modeling. *Methods* 121, 130–137.
- Guo, S., Li, C., Liu, D., Guo, Y., 2015. Inflammatory responses to a *Clostridium perfringens* type A strain and α -toxin in primary intestinal epithelial cells of chicken embryos. *Avian Pathol. J. WVPA* 44, 81–91. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1005573>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gurjar, A., Li, J., McClane, B.A., 2010. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. *Infect. Immun.* 78, 4860–4869.
- Guttenberg, G., Hornei, S., Jank, T., Schwan, C., Lü, W., Einsle, O., Papatheodorou, P., Aktories, K., 2012. Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. *J. Biol. Chem.* 287, 24929–24940.
- Han, X., Du, X.-D., Southey, L., Bulach, D.M., Seemann, T., Yan, X.-X., Bannam, T.L., Rood, J.I., 2015. Functional analysis of a bacitracin resistance determinant located on ICECp1, a novel Tn916-like element from a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6855–6865. <https://doi.org/10.1128/AAC.01643-15>
- Haniford, D.B., Ellis, M.J., 2015. Transposons Tn10 and Tn5. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3-0002-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0002-2014>
- Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., Qadri, I., 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol. J.* 9, 9.
- Harkness, J.M., Li, J., McClane, B.A., 2012. Identification of a lambda toxin-negative *Clostridium perfringens* strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly. *Anaerobe* 18, 546–552.

- Harry, K.H., Zhou, R., Kroos, L., Melville, S.B., 2009. Sporulation and Enterotoxin (CPE) Synthesis Are Controlled by the Sporulation-Specific Sigma Factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 191, 2728–2742. <https://doi.org/10.1128/JB.01839-08>
- Hassan, K.A., Elbourne, L.D.H., Tetu, S.G., Melville, S.B., Rood, J.I., Paulsen, I.T., 2015. Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes. Res. Microbiol. 166, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.003>
- Hennekinne, J.-A., Herbin, S., Firmesse, O., Auvray, F., 2015. European food poisoning outbreaks involving meat and meat-based products. Procedia Food Sci. 5, 93–96.
- Higgins, D., Dworkin, J., 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiol. Rev. 36, 131–148.
- Hiscox, T.J., Harrison, P.F., Chakravorty, A., Choo, J.M., Ohtani, K., Shimizu, T., Cheung, J.K., Rood, J.I., 2013. Regulation of sialidase production in *Clostridium perfringens* by the orphan sensor histidine kinase ReeS. PLoS One 8, e73525.
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L.P., Szklarczyk, D., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2017. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. Mol. Biol. Evol. 34, 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
- Hughes, M.L., Poon, R., Adams, V., Sayeed, S., Saputo, J., Uzal, F.A., McClane, B.A., Rood, J.I., 2007. Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. J. Bacteriol. 189, 7531–7538.
- Husebye, E., 2005. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. Chemotherapy 51, 1–22.
- Huyet, J., Naylor, C.E., Savva, C.G., Gibert, M., Popoff, M.R., Basak, A.K., 2013. Structural Insights into *Clostridium perfringens* Delta Toxin Pore Formation. PLOS ONE 8, e66673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066673>
- Hynes, W.L., Walton, S.L., 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 183, 201–207.
- Irikura, D., Monma, C., Suzuki, Y., Nakama, A., Kai, A., Fukui-Miyazaki, A., Horiguchi, Y., Yoshinari, T., Sugita-Konishi, Y., Kamata, Y., 2015. Identification and Characterization of a New Enterotoxin Produced by *Clostridium perfringens* Isolated from Food Poisoning Outbreaks. PLOS ONE 10, e0138183. doi.org/10.1371/journal.pone.0138183
- Ivie, S.E., Fennessey, C.M., Sheng, J., Rubin, D.H., McClain, M.S. 2011. Gene-trap mutagenesis identifies mammalian genes contributing to intoxication by *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. PLoS One 6, e17787.
- Jana, S., Deb, J.K., 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70, 140–150.
- Jansen, R., Embden, J.D. van, Gastra, W., Schouls, L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol. Microbiol. 43, 1565–1575.
- Jean, D., Briolat, V., Reyssset, G., 2004. Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*. Microbiology 150, 1649–1659.

- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A., Brinkman, F.S.L., Wright, G.D., McArthur, A.G., 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 45, D566–D573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>
- Jin, F., Matsushita, O., Katayama, S., Jin, S., Matsushita, C., Minami, J., Okabe, A., 1996. Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. *Infect. Immun.* 64, 230–237.
- Jost, B.H., Trinh, H.T., Songer, J.G., 2006. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Vet. Microbiol.* 116, 158–165.
- Just, I., Gerhard, R., 2004. Large clostridial cytotoxins, in: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer, pp. 23–47.
- Kalia, V.C., Mukherjee, T., Bhushan, A., Joshi, J., Shankar, P., Huma, N. (2011). Analysis of the unexplored features of rrs (16S rDNA) of the Genus *Clostridium*. *BMC Genomics* 12, 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-18>
- Kawahara, K., Yonogi, S., Munetomo, R., Oki, H., Yoshida, T., Kumeda, Y., Matsuda, S., Kodama, T., Ohkubo, T., Iida, T., Nakamura, S., 2016. Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.042>
- Kazazian, H.H., 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *science* 303, 1626–1632.
- Durimel Kevin, Felten Arnaud, et Mistou Michel-Yves. 2017. ARTWork, a bioinformatics solution dedicated to WGS data management and analysis in the context of foodborne pathogens surveillance and outbreak investigations. *Poster présenté à la journée des doctorants et postdoctorants de l'Anses, octobre 2017.*
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Rubbo, A.D., Rood, J.I., Moore, R.J., 2008. NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens*. *PLOS Pathog.* 4, e26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>
- Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E., Williamson, M.M., Awad, M.M., Rood, J.I., Moore, R.J., 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74, 6496–6500.
- Kim, K.-P., Born, Y., Lurz, R., Eichenseher, F., Zimmer, M., Loessner, M.J., Klumpp, J., 2012. Inducible *Clostridium perfringens* bacteriophages ΦS9 and ΦS63. *Bacteriophage* 2, 89–97. <https://doi.org/10.4161/bact.21363>
- Kim, Y.B., Kim, J.Y., Song, H.S., Lee, C., Kwon, J., Kang, J., Rhee, J.-K., Jeong, M.S., Nam, Y.-D., Roh, S.W., 2017. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens* CBA7123 isolated from a faecal sample from Korea. *Gut Pathog.* 9, 32.
- Kitadokoro, K., Nishimura, K., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Toshima, H., Abe, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S., Karatani, H., Horiguchi, Y., 2011. Crystal Structure of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Displays Features of β-Pore-forming Toxins. *J. Biol. Chem.* 286, 19549–19555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228478>

- Kiu, R., Caim, S., Alexander, S., Pachori, P., Hall, L.J., 2017. Probing Genomic Aspects of the Multi-Host Pathogen *Clostridium perfringens* Reveals Significant Pangenome Diversity, and a Diverse Array of Virulence Factors. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02485>
- Kiu, R., Hall, L.J., 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 141. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
- Knight, D.R., Squire, M.M., Collins, D.A., Riley, T.V., 2017. Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 014 lineage in Australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission. *Front. Microbiol.* 7, 2138.
- Komatsu, H., Inui, A., Sogo, T., Fujisawa, T., 2012. *C. perfringens*. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* 70, 1357–1361.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., Aravind, L., 2001. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 709–742.
- Köser, C.U., Ellington, M.J., Peacock, S.J., 2014. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet.* 30, 401–407.
- Kreil, G., 1995. Hyaluronidases—a group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 4, 1666–1669.
- Kunin, V., Sorek, R., Hugenholtz, P., 2007. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol.* 8, R61.
- Kutter, E., Sulakvelidze, A., 2004. Bacteriophages: biology and applications. CRC Press.
- Lacey, J.A., Allnutt, T.R., Vezina, B., Van, T.T.H., Stent, T., Han, X., Rood, J.I., Wade, B., Keyburn, A.L., Seemann, T., Chen, H., Haring, V., Johanesen, P.A., Lyras, D., Moore, R.J., 2018a. Whole genome analysis reveals the diversity and evolutionary relationships between necrotic enteritis-causing strains of *Clostridium perfringens*. *BMC Genomics* 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4771-1>
- Lacey, J.A., Allnutt, T.R., Vezina, B., Van, T.T.H., Stent, T., Han, X., Rood, J.I., Wade, B., Keyburn, A.L., Seemann, T., Chen, H., Haring, V., Johanesen, P.A., Lyras, D., Moore, R.J., 2018b. Whole genome analysis reveals the diversity and evolutionary relationships between necrotic enteritis-causing strains of *Clostridium perfringens*. *BMC Genomics* 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4771-1>
- Lacey, J.A., Johanesen, P.A., Lyras, D., Moore, R.J., 2016. Genomic diversity of necrotic enteritis-associated strains of *C. perfringens*: a review. *Avian Pathol.* 45, 302–307. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1153799>
- Lacey, J.A., Keyburn, A.L., Ford, M.E., Portela, R.W., Johanesen, P.A., Lyras, D., Moore, R.J., 2017. Conjugation-mediated horizontal gene transfer of *Clostridium perfringens* plasmids in the chicken gastrointestinal tract results in the formation of new virulent strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e01814–17.
- Laconcha, I., Baggesen, D.L., Rementeria, A., Garaizar, J., 2000. Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Vet. Microbiol.* 75, 155–165.
- Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P., Maillard, J.-Y., 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113, 485–498.

- Lepp, D., 2012. Comparative genomic analysis of *Clostridium perfringens* strains associated with necrotic enteritis of poultry, PhD Thesis. 224p.
- Letunic, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Lewis, A.L., Lewis, W.G., 2012. Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. *Cell. Microbiol.* 14, 1174–1182.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Li, J., Adams, V., Bannam, T.L., Miyamoto, K., Garcia, J.P., Uzal, F.A., Rood, J.I., McClane, B.A., 2013. Toxin Plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 77, 208–233. doi.org/10.1128/MMBR.00062-12.
- Li, J., McClane, B.A., 2006. Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4561–4568.
- Li, J., Miyamoto, K., McClane, B.A., 2007. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infect. Immun.* 75, 1811–1819.
- Li, J., Miyamoto, K., Sayeed, S., McClane, B.A., 2010. Organization of the cpe Locus in CPE-Positive *Clostridium perfringens* Type C and D Isolates. *PLoS ONE* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010932>
- Li, J., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., McClane, B.A., 2016. *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. *Microbiol. Spectr.* 4.
- Li, J., Sayeed, S., Robertson, S., Chen, J., McClane, B.A., 2011. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718. *PLoS Pathog.* 7, e1002429.
- Li, J., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2016c. *Clostridium perfringens* Sialidases: Potential Contributors to Intestinal Pathogenesis and Therapeutic Targets. *Toxins* 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8110341>
- Li, X., Xie, Y., Liu, M., Tai, C., Sun, J., Deng, Z., Ou, H.-Y., 2018. oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. *Nucleic Acids Res.* 46, W229–W234. <https://doi.org/10.1093/nar/gky352>
- Lin, Y.-T., Labbe, R., 2003. Enterotoxigenicity and Genetic Relatedness of *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Foods in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1642–1646. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1642-1646.2003>
- Lindström, M., Heikinheimo, A., Lahti, P., Korkeala, H., 2011. Novel insights into the epidemiology of *C. Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol.* 28, 192–198.
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., Cruz, F. de la, 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* 45, 1–8.

- Lucey, B.P., Hutchins, G.M., 2004. William H. Welch, MD, and the Discovery of *Bacillus welchii*. Arch. Pathol. Lab. Med. 128, 1193–1195. [https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2004\)128<1193:WHWMAT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2004)128<1193:WHWMAT>2.0.CO;2)
- Ma, M., Li, J., McClane, B.A., 2012. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Clostridium perfringens* Isolates from Darmbrand Cases in Post-World War II Germany. Infect. Immun. 80, 4354–4363. <https://doi.org/10.1128/IAI.00818-12>
- Ma, M., Vidal, J., Saputo, J., McClane, B.A., Uzal, F., 2011. The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. MBio 2, e00338–10.
- Magnet, S., Blanchard, J.S., 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chem. Rev. 105, 477–498.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 9, 467.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Haft, D.H., 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 13, 722.
- Manich, M., Knapp, O., Gibert, M., Maier, E., Jolivet-Reynaud, C., Geny, B., Benz, R., Popoff, M.R., 2008. *Clostridium perfringens* delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and *Staphylococcus* pore-forming toxins, but shows functional differences. PLoS One 3, e3764.
- Markowitz, V.M., Chen, I.-M.A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N.N., Kyrpides, N.C., 2012. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. Nucleic Acids Res. 40, D115–D122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>
- Maslanka, S.E., Kerr, J.G., Williams, G., Barbaree, J.M., Carson, L.A., Miller, J.M., Swaminathan, B., 1999. Molecular Subtyping of *Clostridium perfringens* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis To Facilitate Food-Borne-Disease Outbreak Investigations. J. Clin. Microbiol. 37, 2209–2214.
- Matsushita, O., Yoshihara, K., Katayama, S., Minami, J., Okabe, A., 1994. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. J. Bacteriol. 176, 149–156.
- McClane, B.A., 2003. *Clostridium perfringens*. FOOD Sci. Technol.-N. Y.-MARCEL DEKKER- 91–104.
- McClane, B.A., Robertson, S.L., Li, J., 2013. *Clostridium perfringens*. Food Microbiol. 465–489. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch18>
- McClane, B.A., Rood, J.I., Bahl, H., DURRE, P., 2001. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections. Clostridia Biotechnol. Med. Appl. Wiley-VCH Wein. Ger. 169–209.
- McInerney, J.O., McNally, A., O’Connell, M.J., 2017. Why prokaryotes have pangenomes. Nat. Microbiol. 2, 17040.

- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 33.
- McLauchlin, J., Ripabelli, G., Brett, M., Threlfall, E., 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00227-0)
- McLauchlin, J., Ripabelli, G., Brett, M.M., Threlfall, E.J., 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 21–28.
- Mehdizadeh Gohari, I., Kropinski, A.M., Weese, S.J., Parreira, V.R., Whitehead, A.E., Boerlin, P., Prescott, J.F., 2016. Plasmid Characterization and Chromosome Analysis of Two netF+ *Clostridium perfringens* Isolates Associated with Foal and Canine Necrotizing Enteritis. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148344>
- Miclard, J., van Baarlen, J., Wyder, M., Grabscheid, B., Posthaus, H., 2009. *C. perfringens*β-toxin binding to vascular endothelial cells in a human case of enteritis necroticans. *J. Med. Microbiol.* 58, 826–828.
- Miyamoto, K., Chakrabarti, G., Morino, Y., McClane, B.A., 2002. Organization of the Plasmid cpe Locus in *Clostridium perfringens* Type A Isolates. *Infect. Immun.* 70, 4261–4272. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4261-4272.2002>
- Miyamoto, K., Fisher, D.J., Li, J., Sayeed, S., Akimoto, S., McClane, B.A., 2006. Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J. Bacteriol.* 188, 1585–1598.
- Miyamoto, K., Yumine, N., Mimura, K., Nagahama, M., Li, J., McClane, B.A., Akimoto, S., 2011. Identification of Novel *Clostridium perfringens* Type E Strains That Carry an Iota Toxin Plasmid with a Functional Enterotoxin Gene. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020376>
- Mönnikes, H., Tebbe, J.J., Hildebrandt, M., Arck, P., Osmanoglou, E., Rose, M., Klapp, B., Wiedenmann, B., Heymann-Mönnikes, I., 2001. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. *Dig. Dis.* 19, 201–211.
- Morris, W.E., Fernández-Miyakawa, M.E., 2009. Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Rev. Argent. Microbiol.* 41, 251–260.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Myers, G.S.A., Rasko, D.A., Cheung, J.K., Ravel, J., Seshadri, R., DeBoy, R.T., Ren, Q., Varga, J., Awad, M.M., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Haft, D.H., Dodson, R.J., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S.A., Khouri, H., Dimitrov, G.I., Watkins, K.L., Mulligan, S., Benton, J., Radune, D., Fisher, D.J., Atkins, H.S., Hiscox, T., Jost, B.H., Billington, S.J., Songer, J.G., McClane, B.A., Titball, R.W., Rood, J.I., Melville, S.B., Paulsen, I.T., 2006. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res.* 16, 1031–1040. <https://doi.org/10.1101/gr.5238106>
- Nariya, H., Miyata, S., Tamai, E., Sekiya, H., Maki, J., Okabe, A., 2011. Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1973–1979.

- Navarro, M.A., McClane, B.A., Uzal, F.A., 2018. Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins. *Toxins* 10, 212.
- Nicholson, W.L., Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Slieman, T.A., Riesenman, P.J., Law, J.F., Xue, Y., 2002. Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 27–32.
- Nizet, V., 2006. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* 8, 11–26.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M.V., Makarova, K.S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H.M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 183, 4823–4838.
- Nowell, V.J., Poppe, C., Parreira, V.R., Jiang, Y.-F., Reid-Smith, R., Prescott, J.F., 2010. *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaerobe* 16, 314–315. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.11.004>
- Obana, N., Nomura, N., Nakamura, K., 2013. Structural requirement in *C. perfringens* collagenase mRNA 5' leader sequence for translational induction through small RNA-mRNA base pairing. *J. Bacteriol.* 195, 2937–2946.
- Obana, N., Shirahama, Y., Abe, K., Nakamura, K., 2010. Stabilization of *Clostridium perfringens* collagenase mRNA by VR-RNA-dependent cleavage in 5' leader sequence. *Mol. Microbiol.* 77, 1416–1428.
- Oda, M., Kihara, A., Yoshioka, H., Saito, Y., Watanabe, N., Uoo, K., Higashihara, M., Nagahama, M., Koide, N., Yokochi, T., Sakurai, J., 2008. Effect of erythromycin on biological activities induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 934–940. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.143677>
- Oda, M., Terao, Y., Sakurai, J., Nagahama, M., 2015. Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Toxins* 7, 5268–5275.
- Ohtani, K., 2016. Gene regulation by the VirS/VirR system in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe, ClostPath* 2015 41, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.003>
- Ohtani, K., Hirakawa, H., Tashiro, K., Yoshizawa, S., Kuhara, S., Shimizu, T., 2010. Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* 16, 258–264.
- Ohtani, K., Kawsar, H.I., Okumura, K., Hayashi, H., Shimizu, T., 2003. The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* strain 13. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 137–141.
- Ohtani, K., Shimizu, T., 2016. Regulation of Toxin Production in *Clostridium perfringens*. *Toxins* 8, 207. <https://doi.org/10.3390/toxins8070207>
- Okumura, K., Kawsar, H.I., Shimizu, T., Ohta, T., Hayashi, H., Shimizu, T., 2005. Identification and characterization of a cell-wall anchored DNase gene in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.019>
- Ondov, B.D., Treangen, T.J., Melsted, P., Mallonee, A.B., Bergman, N.H., Koren, S., Phillippy, A.M., 2016. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol.* 17, 132. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>

- Organization, W.H., 2009. Weekly Epidemiological Record, 2009, vol. 84, 22 [full issue]. Wkly. Epidemiol. Rec. Relevé Épidémiologique Hebd. 84, 197–212.
- Osaki, T., Mabe, K., Hanawa, T., Kamiya, S., 2008. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. J. Med. Microbiol. 57, 814–819.
- Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A., Parkhill, J., 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics 31, 3691–3693.
- Paidhungat, M., Setlow, P., 2001. Localization of a Germinant Receptor Protein (GerBA) to the Inner Membrane of *Bacillus subtilis* Spores. J. Bacteriol. 183, 3982–3990.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2009. SleC is essential for cortex peptidoglycan hydrolysis during germination of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 191, 2711–2720.
- Park, M., Rafii, F., 2018. Effects of Bile Acids and Nisin on the Production of Enterotoxin by *Clostridium perfringens* in a Nutrient-Rich Medium [WWW Document]. Int. J. Microbiol. <https://doi.org/10.1155/2018/7276523>
- Park, M., Rooney, A.P., Hecht, D.W., Li, J., McClane, B.A., Nayak, R., Paine, D.D., Rafii, F., 2010. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and minocycline resistance in *Clostridium perfringens*. Arch. Microbiol. 192, 803–810.
- Parker, M.W., Feil, S.C., 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. Prog. Biophys. Mol. Biol. 88, 91–142.
- Parreira, V.R., Costa, M., Eikmeyer, F., Blom, J., Prescott, J.F., 2012. Sequence of Two Plasmids from *Clostridium perfringens* Chicken Necrotic Enteritis Isolates and Comparison with *C. perfringens* Conjugative Plasmids. PLOS ONE 7, e49753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049753>
- Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P., Frey, J., 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. J. Clin. Microbiol. 43, 2291–2302.
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 7, 104–110.
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. Curr. Opin. Microbiol. 7, 579–586.
- Pons, J.-L., Ageron, E., Mangeney, N., Tessedre, A.-C., Niel, P., Leluan, G., Grimont, P.A.D., 1997. Genetic relationships of *Clostridium bifermentans* and *C. sordellii* analyzed by multilocus enzyme electrophoresis and DNA-DNA hybridization. Syst. Appl. Microbiol. 20, 381–386.
- Popoff Michel R., 2011. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. FEBS J. 278, 4602–4615. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x>
- Popoff, M.R., 2014. Clostridial pore-forming toxins: powerful virulence factors. Anaerobe 30, 220–238.
- Popoff, M.R., Bouvet, P., 2013. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. Toxicon 75, 63–89.

- Popoff, M.R., Bouvet, P., 2009. Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 4, 1021–1064.
- Prescott, J.F., MacInnes, J.I., Wu, A.K., 2016. Taxonomic relationships among the clostridia. *Clostridial Dis. Anim.* 1–5.
- Pruteanu, M., Hyland, N.P., Clarke, D.J., Kiely, B., Shanahan, F., 2010. Degradation of the extracellular matrix components
by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1189–1200.
- Racine, J.S., 2012. RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *J. Appl. Econom.* 27, 167–172.
- Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J., 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1749–1755.
- Revez, J., Espinosa, L., Albiger, B., Leitmeyer, K.C., Struelens, M.J., 2017. Survey on the Use of Whole-Genome Sequencing for Infectious Diseases Surveillance: Rapid Expansion of European National Capacities, 2015–2016. *Front. Public Health* 5. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00347>
- Revitt-Mills, S.A., Rood, J.I., Adams, V., 2015. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiol. Aust.* 36, 114–117.
- Revitt-millsa, S.A., Rooda, J.I., Adamsa, V., n.d. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting.
- Riesenman, P.J., Nicholson, W.L., 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 620–626.
- Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J.I., Smith, C.J., Summers, A.O., Tsuda, M., Berg, D.E., 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 60, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.08.001>
- Robertson, S.L., Li, J., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2011. Evidence for a Prepore Stage in the Action of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin. *PLOS ONE* 6, e22053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022053>
- Roemer, T., Boone, C., 2013. Systems-level antimicrobial drug and drug synergy discovery. *Nat. Chem. Biol.* 9, 222.
- Rohmer, L., Hocquet, D., Miller, S.I., 2011. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 19, 341–348.
- Rood, J.I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B.A., Melville, S.B., Moore, R.J., Popoff, M.R., Sarker, M.R., Songer, J.G., 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*.
- Rood, J.I., Buddle, J.R., Wales, A.J., Sidhu, R., 1985. The occurrence of antibiotic resistance in *Clostridium perfringens* from pigs. *Aust. Vet. J.* 62, 276–279.

- Rood, J.I., Maher, E.A., Somers, E.B., Campos, E., Duncan, C.L., 1978. Isolation and characterization of multiply antibiotic-resistant *Clostridium perfringens* strains from porcine feces. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13, 871–880.
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a012427.
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M., Tsuge, H., Kobayashi, K., 2009. *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins* 1, 208–228.
- Salcedo, C., Arreaza, L., Alcala, B., De La Fuente, L., Vazquez, J.A., 2003. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J. Clin. Microbiol.* 41, 757–762.
- Salyers, A.A., Gupta, A., Wang, Y., 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 12, 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.07.004>
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Sampson, T.R., Saroj, S.D., Llewellyn, A.C., Tzeng, Y.-L., Weiss, D.S., 2013. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature* 497, 254.
- Sarker, M.R., Carman, R.J., McClane, B.A., 2000. Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol. Microbiol.* 35, 249–249.
- Sasaki, Y., Yamamoto, K., Tamura, Y., Takahashi, T., 2001. Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *C. septicum* and *C. sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Vet. Microbiol.* 83, 61–69.
- Savva, C.G., Fernandes da Costa, S.P., Bokori-Brown, M., Naylor, C.E., Cole, A.R., Moss, D.S., Titball, R.W., Basak, A.K., 2013. Molecular Architecture and Functional Analysis of NetB, a Pore-forming Toxin from *Clostridium perfringens*. *J. Biol. Chem.* 288, 3512–3522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430223>
- Sawires, Y.S., Songer, J.G., 2006. *C. perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* 12, 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.10.002>
- Sawires, Y.S., Songer, J.G., 2005. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* 11, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.03.004>
- Sayeed, S., Li, J., McClane, B.A., 2007. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infect. Immun.* 75, 2391–2398.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>

- Scaria, J., Ponnala, L., Janvilisri, T., Yan, W., Mueller, L.A., Chang, Y.-F., 2010. Analysis of ultra low genome conservation in *Clostridium difficile*. PLoS One 5, e15147.
- Schalch, B., Bader, L., Schau, H.-P., Bergmann, R., Rometsch, A., Maydl, G., Kessler, S., 2003. Molecular typing of *Clostridium perfringens* from a food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41, 892–895.
- Schirmer, J., Aktories, K., 2004. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj. 1673, 66–74.
- Schultz, D., Wolynes, P.G., Jacob, E.B., Onuchic, J.N., 2009. Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 21027–21034. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912185106>
- Schwartzman, J.D., Reller, L.B., Wang, W.-L.L., 1977. Susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from human infections to twenty antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 11, 695–697.
- Seal, B.S., Fouts, D.E., Simmons, M., Garrish, J.K., Kuntz, R.L., Woolsey, R., Schegg, K.M., Kropinski, A.M., Ackermann, H.-W., Siragusa, G.R., 2011. *C. perfringens* bacteriophages ΦCP390 and ΦCP26F: genomic organization and proteomic analysis of the virions. Arch. Virol. 156, 25–35. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0812-z>
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinforma. Oxf. Engl. 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seike, S., Miyamoto, K., Kobayashi, K., Takehara, M., Nagahama, M., 2016. *Clostridium perfringens* Delta-Toxin Induces Rapid Cell Necrosis. PLoS ONE 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147957>
- Severi, E., Hood, D.W., Thomas, G.H., 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. Microbiology 153, 2817–2822.
- Shariat, N., DiMarzio, M.J., Yin, S., Dettinger, L., Sandt, C.H., Lute, J.R., Barrangou, R., Dudley, E.G., 2013. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. Food Microbiol. 34, 164–173.
- Shimizu, T., Ba-Thein, W., Tamaki, M., Hayashi, H., 1994. The virR gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *C. perfringens*. J. Bacteriol. 176, 1616–1623.
- Shimizu, T., Ohshima, S., Ohtani, K., Shimizu, T., Hayashi, H., 2001. Genomic map of *Clostridium perfringens* strain 13. Microbiol. Immunol. 45, 179–189.
- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H., 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 996–1001.
- Shrestha, A., McClane, B.A., 2013. Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin. MBio 4, e00594–12.

- Sirous, M., Namaki, S., Mirshafiey, A., 2009. Clostridia. J. Chin. Clin. Med. 4.
- Sonnier, D.I., Bailey, S.R., Schuster, R.M., Lentsch, A.B., Pritts, T.A., 2010. TNF- α induces vectorial secretion of IL-8 in Caco-2 cells. J. Gastrointest. Surg. 14, 1592–1599.
- Speit, G., Haupter, S., Schütz, P., Kreis, P., 1999. Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 439, 213–221.
- Stark, R.L., Duncan, C.L., 1971. Biological characteristics of *C. perfringens* type A enterotoxin. Infect. Immun. 4, 89–96.
- Stasiewicz, M.J., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., 2015. Genomics tools in microbial food safety. Curr. Opin. Food Sci. 4, 105–110.
- Stevens, D.L., Aldape, M.J., Bryant, A.E., 2012. Life-threatening clostridial infections. Anaerobe 18, 254–259.
- Stevens, E.L., Timme, R., Brown, E.W., Allard, M.W., Strain, E., Bunning, K., Musser, S., 2017. The public health impact of a publically available, environmental database of microbial genomes. Front. Microbiol. 8, 808.
- Stiles, B.G., Barth, G., Barth, H., Popoff, M.R., 2013. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man? Toxins 5, 2138–2160. <https://doi.org/10.3390/toxins5112138>
- Stiles, B.G., Barth, H., Popoff, M.R., 2016. *Clostridium perfringens* iota toxin: a successfully shared template for common enteric pathogens. Microb. Toxins 1–20.
- Stragier, P., 2002. A gene odyssey: exploring the genomes of endospore-forming bacteria, in: *Bacillus Subtilis* and Its Closest Relatives. American Society of Microbiology, pp. 519–525.
- Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E.V., Krylov, D.M., Mazumder, R., Mekhedov, S.L., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Smirnov, S., Sverdlov, A.V., Vasudevan, S., Wolf, Y.I., Yin, J.J., Natale, D.A., 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics 4, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-41>
- Terns, M.P., Terns, R.M., 2011. CRISPR-based adaptive immune systems. Curr. Opin. Microbiol. 14, 321–327.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., Medini, D., 2008. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. Curr. Opin. Microbiol. 11, 472–477.
- Theoret, J.R., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2015a. Identification and Characterization of *Clostridium perfringens* Beta Toxin Variants with Differing Trypsin Sensitivity and In Vitro Cytotoxicity Activity. Infect. Immun. 83, 1477–1486. <https://doi.org/10.1128/IAI.02864-14>
- Theoret, J.R., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2015b. Identification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin variants with differing trypsin sensitivity and in vitro cytotoxicity activity. Infect. Immun. 83, 1477–1486.
- Thépault, A., Méric, G., Rivoal, K., Pascoe, B., Mageiros, L., Touzain, F., Rose, V., Béven, V., Chemaly, M., Sheppard, S.K., 2017. Genome-Wide Identification of Host-Segregating Epidemiological Markers for Source Attribution in *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.03085-16>

- Titball, R.W., Naylor, C.E., Basak, A.K., 1999. The *Clostridium perfringens* α -toxin. *Anaerobe* 5, 51–64. <https://doi.org/10.1006/anae.1999.0191>
- Tweten, R.K., 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect. Immun.* 73, 6199–6209.
- Tyson, G.W., Banfield, J.F., 2008. Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environ. Microbiol.* 10, 200–207.
- Uzal, F.A., 2004. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe* 10, 135–143.
- Uzal, F.A., Freedman, J.C., Shrestha, A., Theoret, J.R., Garcia, J., Awad, M.M., Adams, V., Moore, R.J., Rood, J.I., McClane, B.A., 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 9, 361–377. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.168>
- Uzal, F.A., Vidal, J.E., McClane, B.A., Gurjar, A.A., 2010. *C. Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxinology J.* 2, 24–42.
- Vaillant, V., Jourdan-Da Silva, N., Quilici, M.-L., Couturier, E., Le Guyader, S., Delmas, G., Le Saux, J.-C., 2012. Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. *Bull. Epidemiol. Hebd.* HS, 34–37.
- Vaillant, V., Valk, H.D., Baron, E., Ancelle, T., Colin, P., Delmas, M.-C., Dufour, B., Pouillot, R., Strat, Y.L., Weinbreck, P., 2005. Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 221–232.
- Van Asten, A.J.A.M., Nikolaou, G.N., Gröne, A., 2010. The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet. J. Lond. Engl.* 197 183, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.11.005>
- Van Der Oost, J., Westra, E.R., Jackson, R.N., Wiedenheft, B., 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 479.
- Van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, 203.
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., Van Houdt, R., 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 709–730.
- Vasudevan, P., Weaver, A., Reichert, E.D., Linnstaedt, S.D., Popham, D.L., 2007. Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K. *Mol. Microbiol.* 65, 1582–1594.
- Vergnaud, G., Pourcel, C., 2009. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis, in: *Molecular Epidemiology of Microorganisms*. Springer, pp. 141–158.
- Veshnyakova, A., Protze, J., Rossa, J., Blasig, I.E., Krause, G., Piontek, J., 2010. On the Interaction of *Clostridium perfringens* Enterotoxin with Claudins. *Toxins* 2, 1336–1356. <https://doi.org/10.3390/toxins2061336>

- Vidal, J.E., McClane, B.A., Saputo, J., Parker, J., Uzal, F.A., 2008. Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. *Infect. Immun.* 76, 4396–4404.
- Vidal, J.E., Ohtani, K., Shimizu, T., McClane, B.A., 2009. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cell. Microbiol.* 11, 1306–1328. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01332.x>
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., Eichenberger, P., 2006. The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 358, 16–37.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319–346.
- Waters, M., Savoie, A., Garmory, H.S., Bueschel, D., Popoff, M.R., Glenn Songer, J., Titball, R.W., McClane, B.A., Sarker, M.R., 2003. Genotyping and Phenotyping of Beta2-Toxigenic *Clostridium perfringens* Fecal Isolates Associated with Gastrointestinal Diseases in Piglets. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3584–3591. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3584-3591.2003>
- Westbrook, A.M., Wei, B., Hacke, K., Xia, M., Braun, J., Schiestl, R.H., 2011. The role of tumour necrosis factor- α and tumour necrosis factor receptor signalling in inflammation-associated systemic genotoxicity. *Mutagenesis* 27, 77–86.
- Westra, E.R., Buckling, A., Fineran, P.C., 2014. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 317.
- Wisniewski, J.A., Rood, J.I., 2017. The Tcp conjugation system of *Clostridium perfringens*. *Plasmid* 91, 28–36.
- Wisniewski, J.A., Teng, W.L., Bannam, T.L., Rood, J.I., 2015. Two Novel Membrane Proteins, TcpD and TcpE, Are Essential for Conjugative Transfer of pCW3 in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 197, 774–781. <https://doi.org/10.1128/JB.02466-14>
- Woudstra, C., Le Maréchal, C., Souillard, R., Bayon-Auboyer, M.-H., Mermoud, I., Desoutter, D., Fach, P., 2016. New Insights into the Genetic Diversity of *Clostridium botulinum* Group III through Extensive Genome Exploration. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00757>
- Wu, J.-J., Sheu, B.-S., Huang, A.-H., Lin, S.-T., Yang, H.-B., 2006. Characterization of flgK gene and FlgK protein required for *Helicobacter pylori* Colonization-from cloning to clinical relevance. *World J. Gastroenterol. WJG* 12, 3989.
- Wüst, P.K., Horn, M.A., Drake, H.L., 2011. *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* as active fermenters in earthworm gut content. *ISME J.* 5, 92–106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.99>
- Xiao, Y., Wagendorp, A., Moezelaar, R., Abee, T., Wells-Bennik, M.H., 2012. A wide variety of *Clostridium perfringens* type A food-borne isolates that carry a chromosomal *cpe* gene belong to one multilocus sequence typing cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7060–7068.
- Yadav, J.P., Das, S.C., Dhaka, P., Mukhopadhyay, A.K., Chowdhury, G., Naskar, S., Malik, S.S., 2018. Pulsed-field gel electrophoresis of enterotoxic *Clostridium perfringens* type A isolates recovered from humans and animals in Kolkata, India. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 6, 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.002>

- Yadav, J.P., Das, S.C., Dhaka, P., Vijay, D., Kumar, M., Mukhopadhyay, A.K., Chowdhury, G., Chauhan, P., Singh, R., Dhama, K., Malik, S.V.S., Kumar, A., 2017. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* type A isolates from humans, animals, fish and their environment. *Anaerobe* 47, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.009>
- Yang, W.-W., Crow-Willard, E. n., Ponce, A., 2009. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *J. Appl. Microbiol.* 106, 27–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03931.x>
- Yang, Z., 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1586–1591. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm088>
- Yasugi, M., Sugahara, Y., Hoshi, H., Kondo, K., Talukdar, P.K., Sarker, M.R., Yamamoto, S., Kamata, Y., Miyake, M., 2015. In vitro cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* isolate carrying a chromosomal cpe gene is exclusively dependent on sporulation and enterotoxin production. *Microb. Pathog.* 85, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.04.003>
- Yin, S., Jensen, M.A., Bai, J., DebRoy, C., Barrangou, R., Dudley, E.G., 2013. Evolutionary divergence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is reflected in CRISPR spacer composition. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM–00950.
- Yonogi, S., Kanki, M., Ohnishi, T., Shiono, M., Iida, T., Kumeda, Y., 2016. Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes cpe and becAB. *J. Microbiol. Methods* 127, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.007>
- Yonogi, S., Matsuda, S., Kawai, T., Yoda, T., Harada, T., Kumeda, Y., Gotoh, K., Hiyoshi, H., Nakamura, S., Kodama, T., 2014. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect. Immun.* 82, 2390–2399.
- Yutin, N., Galperin, M.Y., 2013. A genomic update on clostridial phylogeny: G ram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* 15, 2631–2641.
- Zachariah, S.K., 2011. Adult necrotizing enterocolitis and non occlusive mesenteric ischemia. *J. Emerg. Trauma Shock* 4, 430.
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J., Wishart, D.S., 2011. PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res.* 39, W347–W352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>
- Zimmer, M., Scherer, S., Loessner, M.J., 2002. Genomic Analysis of *Clostridium perfringens* Bacteriophage ϕ 3626, Which Integrates into *guaA* and Possibly Affects Sporulation. *J. Bacteriol.* 184, 4359–4368. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4359-4368.2002>

VI– ANNEXES

Annexe 1. Description des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC

N° TIAC	Année	Aliment suspecté	Personnes touchées (n)	cfu/g	Souches récupérées (n)	Profils identifiés (n)	Profil toxinique	Autre pathogène isolé	cfu/g
2207	2013	Végétale	130	3.7E+06	1	1	XIII	-	-
2253	2013	Viande de volaille	160	6.0E+06	1	1	XIII	-	-
435	2014	Autre	22	3.0E+02	1	1	IV	-	-
1601	2014	Autre	15	3.5E+05	1	1	IV	BC	2.7E+04
1622	2014	Autre	21	1.1E+04	1	1	X	-	-
2370	2014	Viande porcine	27	2.6E+03	1	1	V	-	-
529	2015	Végétale	6	3.0E+01	2	2	X ; IX	BC	1.5E+03
538	2015	Viande de volaille	38	1.5E+04	7	1	V	-	-
2291	2015	Viande porcine	118	4.0E+06	5	1	V	-	-
2318	2015	Viande de volaille	34	1.1E+03	1	1	V	-	-
2540	2015	Végétale	9	4.0E+02	2	2	X ; X	BC	8.0E+03
2606	2015	Végétale	9	3.7E+02	5	2	X ; X	BC	1.0E+05
ND	2015	ND	5	ND	5	2	X, XIV	ND	ND
2727	2015	Viande porcine	7	3.7E+03	3	2	IV ; X	-	-
2773	2015	Viande de volaille	50	1.5E+07	5	1	VII	-	-
2774	2015	Viande de volaille	50	1.5E+07	5	1	VII	-	-
2987	2015	Viande de volaille	39	3.6E+04	8	1	VII	-	-
2988	2015	Viande de volaille	39	1.4E+02	4	2	VII ; X	BC	1.4E+05
3803	2015	Viande porcine	4	1.3E+04	4	2	X; XI	SCP	4.0E+02
3958	2015	Viande porcine	NK	1.6E+02	5	1	XI	-	-
3863	2015	Végétale	20	2.2E+02	5	3	VII ; XIII; XV	-	-
4068	2015	Autre	2	4.0E+04	2	1	X	-	-

Annexe 1. Description des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC (suite)

N° TIAC	Année	Aliment suspecté	Personnes touchées (n)	cfu/g	Souches récupérées (n)	Profils identifiés (n)	Profil toxinique	Autre pathogène isolé	cfu/g
4092	2015	Viande bovine	30	1.2E+02	4	1	IV	-	-
4115	2015	Végétale	2	3.6E+01	2	2	X ; XI	-	-
4127	2015	Viande porcine	26	5.8E+05	4	1	VI	-	-
4138	2016	Autre	1	6.0E+02	3	1	X	-	-
370	2016	Végétale	8	4.0E+01	1	1	III	BC	1.0E+03
490	2016	Viande volaille	40	7.0E+01	5	1	V	-	-
553	2016	ND	4	8.0E+02	1	1	XI	-	-
1781	2016	Végétale	28	1.1E+05	5	1	XI	-	-
1782	2016	Végétale	28	4.0E+01	1	1	XI	BC	5.5E+04
1923	2016	Végétale	13	8.4E+04	5	1	VII	-	-
3199	2016	Végétale	5	4.0E+01	1	1	X	-	-
3566	2016	Végétale	51	2.4E+06	5	1	IV	-	-
4286	2016	Végétale	2	4.0E+01	1	1	I	BC	4.0E+03
4430	2016	Viande bovine	2	1.1E+03	5	1	VII	-	-
4493	2017	Végétale	2	3.6E+02	4	3	X ; XI ; XII	BC	1.5E+04
4755	2017	Végétale	120	9.3E+02	5	1	V	-	-
274	2017	Viande bovine	2	4.0E+02	1	1	X	-	-
759	2017	Viande bovine	31	4.9E+06	5	1	II	-	-
762	2017	Viande bovine	31	7.0E+01	4	1	II	-	-
1270	2017	Viande bovine	41	1.9E+03	5	1	X	-	-
1758	2017	Viande bovine	52	4.0E+05	2	2	IV, V	-	-
1149	2018	ND	80	ND	1	1	III	-	-

Annexe 2. Principe de l'extraction de l'ADN avec le kit WIZARD Genomic DNA Purification de PROMEGA (réf : A1120).

Le kit de purification d'ADN génomique Wizard est conçu pour l'isolement de l'ADN à partir de bactéries Gram-positives. Le kit est basé sur un processus en quatre étapes. La première étape dans la procédure de purification consiste à la lyse des cellules et des noyaux. Une étape de digestion par RNase. Ensuite, les protéines cellulaires sont éliminées par une étape de précipitation au sel, qui précipite les protéines, mais laisse l'ADN génomique à haut poids moléculaire en solution. Enfin, l'ADN génomique est concentré et dessalé par la précipitation d'isopropanol. Les étapes du principe de l'isolement de l'ADN sont les suivantes :

- 1 : À partir d'une souche pure en cryobille, effectuer un isolement sur gélose au sang et incubé 18 h $\pm$ 4 h à 37°C. Faire une suspension bactérienne à une DO à 600 nm égale à $2 \pm 0,3$.
- 2 : Centrifuger 2 ml de culture pendant 2 minutes à 16 000 g et jeter le surnageant.
- 3 : Dissoudre le culot cellulaire dans 480 μ l d'Ethylène diamine tétra acétique (EDTA) à 50 mM et ajouter 120 μ l de lysosyme à 10 mg/ml. Incuber 60 minutes à 37°C.
- 4 : Centrifuger pendant 2 minutes à 16 000 g et jeter le surnageant puis ajouter 600 μ l de *Nuclei Lysis Solution* et mélanger doucement par pipetage. Incuber 30 minutes à 80°C et laisser refroidir à 4°C pendant 5 minutes.
- 5 : Ajouter 3 μ l de RNase Solution et vortexer, incubé 60 minutes à 37°C, laisser refroidir et ajouter 200 μ l de *Protein Precipitation*, vortexer à nouveau et incubé 20 minutes dans la glace.
- 6 : Centrifuger pendant 3 minutes à 16 000 g. Transférer le surnageant dans un tube contenant 600 μ l d'isopropanol. Remuer doucement jusqu'à formation d'un précipité (ADN).
- 7 : Centrifuger pendant 2 min à 16 000 g et jeter le surnageant. Ajouter 600 μ l d'éthanol à 70%, décrocher l'ADN en mélangeant doucement.
- 8 : Centrifuger pendant 2 minutes à 16 000 g, aspirer l'éthanol et sécher le culot.
- 9 : Réhydrater l'ADN dans 100 μ l de TRIS 10 mM et stocker à 4°C.

Annexe 3. Description des génomes de 146 souches de *C. perfringens*

Souches	Taille génome (pb)	Contigs (n)	GC (%)	CDS prédites (n)
15SBCL1664	2912570	14	27,95	2353
15SBCL801	3222809	2	28,15	2951
15SBCL899	3248723	11	28,1	2473
15SBCL900	3329347	29	28,05	2555
16SBCL106	2931062	11	27,89	2398
16SBCL1078	3309942	8	28,11	2494
16SBCL1079	3308549	5	28,11	2705
16SBCL107	2926914	14	27,81	2407
16SBCL1080	3308935	7	28,11	2721
16SBCL1081	3309958	4	28,11	2494
16SBCL1082	3309441	12	28,11	2717
16SBCL1083	3247356	32	28,14	2583
16SBCL109	2957576	26	27,89	2391
16SBCL110	2832290	5	27,95	2305
16SBCL111	3184484	6	28,11	2445
16SBCL1126	3013819	15	27,83	2391
16SBCL1127	3010308	10	27,83	2398
16SBCL1128	3004890	21	27,84	2391
16SBCL1129	3017843	2	27,83	2401
16SBCL1130	3009694	3	27,85	2397
16SBCL113	2922067	18	27,89	2422
16SBCL1141	3154737	11	28,16	2606
16SBCL1142	3338595	5	28,07	2685
16SBCL1143	3360719	16	28,03	2639
16SBCL1144	3203065	14	28,02	2491
16SBCL1344	3454849	10	28,48	2709
16SBCL1431	2913023	11	27,93	2286
16SBCL1432	2920801	5	27,94	2291
16SBCL1433	2921415	6	27,94	2288
16SBCL1434	2922398	10	27,95	2299
16SBCL1435	2921260	11	27,95	2292
16SBCL1584	2928613	9	27,88	2366
16SBCL1585	2929830	10	27,88	2383
16SBCL1586	2929726	5	27,88	2381
16SBCL1587	2928714	15	27,88	2372
16SBCL1588	2940481	41	27,9	2380
16SBCL1589	3386997	19	28,02	2643
16SBCL1590	3169450	17	28,18	2592
16SBCL1591	3396554	33	28,02	2634
16SBCL1592	3046164	13	28,57	2159
16SBCL525	3375749	19	28,11	2664

Annexe 3. Description des génomes de 146 souches de *C. perfringens* (suite)

Souches	Taille génome (pb)	Contigs (n)	GC (%)	CDS prédites (n)
16SBCL528	2936988	16	27,88	2441
16SBCL529	2926730	14	27,88	2438
16SBCL530	2927828	3	27,89	2439
16SBCL531	2933456	27	27,9	2442
16SBCL532	2934707	18	27,89	2439
16SBCL537	3239150	36	28,16	2667
16SBCL538	3092692	16	28,24	2166
16SBCL563	2995080	11	27,83	2498
16SBCL564	2988031	10	27,81	2502
16SBCL565	2948958	10	27,82	2503
16SBCL566	2954442	20	27,83	2502
16SBCL567	2952059	10	27,81	2501
16SBCL570	3399620	17	28,07	2721
16SBCL575	5903862	16	28,66	1578
16SBCL576	5578235	20	27,91	1635
16SBCL577	3310454	16	28,01	2553
16SBCL578	4194359	15	29,94	2486
16SBCL579	2951842	19	27,82	2494
16SBCL580	3371840	16	28,06	2657
16SBCL581	3490465	17	28,2	2671
16SBCL582	2934861	16	27,86	2386
16SBCL583	2934254	19	27,85	2381
16SBCL584	2942260	15	27,85	2385
16SBCL585	2937153	19	27,86	2385
16SBCL586	3296390	14	27,74	2404
16SBCL587	2937192	14	27,85	2372
16SBCL588	2941895	13	27,86	2386
16SBCL589	2937381	18	27,85	2383
16SBCL590A	2940486	2	27,86	2387
16SBCL590B	2938783	14	27,84	2387
16SBCL591	2939455	12	27,86	2382
16SBCL592A	2939235	21	27,86	2378
16SBCL592B	2932279	14	27,86	2379
16SBCL593A	2895012	5	27,86	2377
16SBCL593B	2933474	6	27,85	2374
16SBCL595	2936335	20	27,85	2384
16SBCL596A	2939320	16	27,86	2380
16SBCL596B	3276833	4	28,13	2661
16SBCL599	3368767	5	28,15	2699
16SBCL600	3366003	7	28,14	2694
16SBCL601	2944364	8	27,87	2376

Annexe 3. Description des génomes de 146 souches de *C. perfringens* (suite)

Souches	Taille génome (pb)	Contigs (n)	GC (%)	CDS prédites (n)
16SBCL602	3345809	10	28,04	2732
16SBCL603	3227688	16	28,12	2612
16SBCL604	3225648	9	28,11	2603
16SBCL605	3345303	17	28,04	2729
16SBCL606	3345378	17	28,04	2724
16SBCL607	2929873	16	27,88	2410
16SBCL608	2923849	80	27,86	2409
16SBCL609	2922696	3	27,86	2417
16SBCL610	2919443	10	27,87	2387
16SBCL611	2937753	30	27,8	2400
16SBCL615	3321965	9	28,04	2709
16SBCL616	3319235	15	28,03	2704
16SBCL617	2956224	11	27,95	2299
16SBCL618	2951058	4	27,95	2302
16SBCL620	2950624	71	27,95	2304
16SBCL621	3032078	62	27,96	2298
16SBCL624	3311941	17	28,09	2683
16SBCL625	3127712	27	28,14	2524
16SBCL627	2885082	18	27,94	2246
16SBCL628	2909217	16	27,89	2292
16SBCL629	2911608	19	27,89	2286
16SBCL631	2910961	12	27,89	2286
16SBCL632	3300015	13	28,13	2676
16SBCL648	3366944	3	28,02	2710
16SBCL816	3311618	9	28,08	2683
16SBCL939	3476569	28	28,03	2602
16SBCL940	3470502	8	28,72	2486
16SBCL941	2924230	9	27,87	2442
16SBCL942	2917385	13	27,9	2442
16SBCL943	2926588	13	27,9	2444
16SBCL944	2933098	12	27,87	2434
16SBCL945	2929298	6	27,88	2446
17SBCL1132	2919836	6	27,88	2441
17SBCL1133	2922162	5	27,87	2448
17SBCL1134	3328397	5	28,08	2715
17SBCL1136	3701351	8	27,85	2662
17SBCL1137	3331390	5	28,03	2566
17SBCL19	2936723	89	27,84	2538
17SBCL20	2991607	51	27,93	2368
17SBCL21	2894135	11	27,93	2371
17SBCL22	2901114	8	27,93	2368

Annexe 3. Description des génomes de 146 souches de *C. perfringens* (suite)

Souches	Taille génome (pb)	Contigs (n)	GC (%)	CDS prédites (n)
17SBCL23	2898057	8	27,92	2364
17SBCL335	2897915	10	27,93	2369
17SBCL336	2898016	8	27,92	2365
17SBCL337	3345557	7	28,12	2697
17SBCL338	3345427	8	28,11	2697
17SBCL339	3344330	6	28,11	2695
17SBCL67	3344774	23	28,1	2691
17SBCL767	3344773	21	28,11	2693
17SBCL768	3272176	18	28,14	2667
17SBCL79	3529201	21	27,96	2598
17SBCL80	3543186	7	27,94	2590
17SBCL81	3402849	24	28,18	2737
17SBCL82	3379669	26	28,05	2739
17SBCL83	3600379	24	28,13	2735
17SBCL85	3378793	17	28,04	2733
17SBCL86	3463041	38	28,07	2738
17SBCL87	3381623	25	28,05	2742
17SBCL88	3380009	10	28,04	2739
17SBCL512	3379747	21	28,04	2736
17SBCL513	3378736	18	28,04	2740
17SBCL738	2909333	7	27,84	2508
17SBCL739	2910210	8	27,82	2500
18SBCL173	3003638	8	28,27	2152

Annexe 4. Protocole de préparation des surnageants bactériens

- A partir de souches conservées à -25 °C en cryobilles, prendre pour chaque souche une cryobille, la déposer sur la surface de gélose Columbia au sang et ensemercer la gélose en la striant avec la cryobille.
- Placer les boîtes en condition d'anaérobiose.
- Incuber celles-ci dans une étuve à 37 °C pendant 18 - 24 heures.
- Le lendemain, ensemercer une colonie bien isolée pour chaque souche dans un tube contenant 10 ml de milieu Thioglycolate.
- Placer les tubes de culture en condition d'anaérobiose.
- Incuber les tubes dans une étuve à 37 °C pendant 18-24 heures.
- le lendemain ensemercer 100 µl de culture dans un tube contenant 10 ml de milieu Thioglycolate et incuber dans une étuve en condition d'anaérobiose pendant 6-8 heures.
- Les cultures en phase stationnaire et exponentielle sont ensuite transférées dans des tubes stériles de 15 ml
- Centrifuger les cultures dans des tubes de 15 ml pendant 20 minutes à 4°C à 900 g.
- A l'aide d'une seringue et d'un filtre 0,2 µm stériles, le surnageant est prélevé et filtré dans un nouveau tube en polypropylène stérile de 15 ml puis placé à 4°C jusqu'à analyses des toxines.
- Le surnageant peut être conservé à + 4°C ou à - 20°C avant utilisation pendant environ un mois.

Annexe 5. Protocole de réalisation des tests ELISA

J-1

Coating des plaques : 11 µl d'anticorps (Ac IR IL-8) qsp 11 ml de Coating Buffer (11ml/plaque)
Mettre 100 µl/puits.

J-2

Effectuer 3 lavages au PBS/Tween 0,05 %. Saturer les plaques par 200 µl de SBB pendant une heure.

Réaliser une gamme d'IL8 rec (de 1000 pg/ml à 7,9 pg/ml) : 1 µl d'IL8 rec qsp 1 ml de PBS/BSA 1 % puis réaliser des dilutions au 1/10^e en cascade.

Vider les plaques et ajouter la gamme et les échantillons selon les plans de plaques (100 µl/w) : mettre 1h30 à température ambiante sous agitation.

Préparation de l'Ac II^R biotynylé :

1,5 µl d'Ac II^R biotynylé qsp 6 ml de PBS/BSA 1 %.

Effectuer 3 lavages PBS/Tween 0.05 %.

Ajouter l'Ac II^R biotynylé (50 µl/w) → TA 1 h sous agitation.

Préparation de la streptavidin peroxydase :

1,1 µl de streptavidin peroxydase qsp 11 ml de PBS/Tween 0,05 %

Effectuer 3 lavages PBS/Tween 0.05 %

Ajouter la streptavidin peroxydase (100 µl/w) → TA 45 min sous agitation

Effectuer 3 lavages PBS/Tween 0.05 %

Ajouter la solution de TMB (50 µl/w) → jusqu'à une coloration bleue

Stopper la réaction par 50 µL de H₂SO₄ 1M → coloration jaune

Lecture à 405 nm (au fluostar optima)

Annexe 6. Description des souches analysées en cytotoxicité

Souches	Profil de gène de virulence	Phase exponentielle		Phase stationnaire	
		Concentration avec effet cytotoxique-24 h	Concentration avec effet inflammatoire-24h	Concentration avec effet cytotoxique-24 h	Concentration avec effet inflammatoire-24h
15SBCL816	VIII	-	12,50%	-	6,25%
15SBCL899	XI	-	12,50%	-	6,25%
15SBCL900	XIV	-	12,50%	-	6,25%
15SBCL1664	V	-	12,50%	-	6,25%
16SBCL106	XIII	-	-	-	-
16SBCL107	XIII	-	-	-	-
16SBCL109	IV	-	-	-	-
16SBCL110	IV	-	-	6,25%	-
16SBCL111	X	-	6,25%	-	12,50%
16SBCL113	V	-	12,50%	-	12,50%
16SBCL529	V	-	6,25%	-	6,25%
16SBCL537	X	-	6,25%	-	6,25%
16SBCL538	IX	-	-	-	-
16SBCL940	V	-	6,25%	12,50%	12,50%
16SBCL563	V	-	-	-	-
16SBCL570	VIII	-	12,50%	-	6,25%
16SBCL571	X	-	12,50%	-	6,25%
16SBCL572	VIII	-	12,50%	-	6,25%
16SBCL573	X	-	12,50%	25,00%	6,25%
16SBCL577	IV	-	6,25%	6,25%	12,50%
16SBCL578	X	-	6,25%	-	6,25%
16SBCL582	VII	-	6,25%	-	6,25%
16SBCL585	VII	-	6,25%	-	6,25%
16SBCL591	VII	-	-	-	-
16SBCL596B	X	-	-	-	-
16SBCL599	VII	-	12,50%	-	12,50%

Annexe 6. Description des souches analysées en cytotoxicité (suite)

Souches	Profil de gène de virulence	Phase exponentielle		Phase stationnaire	
		Concentration avec effet cytotoxique-24 h	Concentration avec effet inflammatoire-24h	Concentration avec effet cytotoxique-24 h	Concentration avec effet inflammatoire-24h
16SBCL1141	XI	-	6,25	-	6,25
16SBCL1344	X	-	12,50%	-	6,25
16SBCL1431	IV	-	12,50%	-	6,25
16SBCL600	X	-	6,25%	-	6,25%
16SBCL608	VII	-	12,50%	-	12,50%
16SBCL609	XV	-	6,25%	-	6,25%
16SBCL610	X	-	12,50%	-	12,50%
16SBCL615	IV	-	6,25	-	6,25
16SBCL620	X	-	12,50%	-	6,25
16SBCL621	XI	-	12,50%	-	6,25
16SBCL624	VI	6,25%	3,13	-	6,25
16SBCL629	XI	-	6,25	-	6,25
16SBCL525	III	-	6,25	-	6,25
16SBCL648	XI	-	12,50%	-	12,50%
16SBCL1078	X	-	6,25	-	6,25
16SBCL1083	X	-	12,50%	-	6,25
16SBCL1126	VII	-	12,50%	-	6,25
16SBCL1552	I	-	6,25%	-	6,25
16SBCL1584	VII	-	6,25%	-	6,25
16SBCL1589	X	-	6,25%	12,50%	6,25
16SBCL1590	XI	-	12,50%	-	6,25
16SBCL1592	XII	-	12,50%	-	6,25
17SBCL19	V	-	12,50%	-	6,25
17SBCL67	X	-	-	-	-
17SBCL79	II	-	12,50%	-	25%
17SBCL85	II	-	6,25%	-	3,13
17SBCL335	X	-	6,25%	-	6,25
18SBCL173	VI	-	25%	-	12,50%

Toxin characteristics and genetic diversity of *C. perfringens* strains involved in foodborne outbreaks in Ile-de-France

Clostridium perfringens represents the fourth agent responsible for foodborne outbreaks (FBO) in France and the rest of Europe. The bacterium is classified into seven toxinotypes (A-G) based upon the production of six major toxins, namely CPA, CPB, ETX, ITX, CPE and NetB. It has been demonstrated that the enterotoxin CPE, encoded by the *cpe* gene, is essential to the development of gastroenteritis. However, 22 virulence factors comprising toxins and hydrolytic enzymes produced by *C. perfringens* strains are currently established in the literature for which no functional data are available, and their role in FBO remains unknown since the reference method namely -EN NF ISO 7937- used to certify the presence of *C. perfringens* involved in FBO is not able to provide any phenotypic information with regard to their virulence. In addition, no genotypic characterization is currently available to link *C. perfringens* strains to a particular reservoir or their prevalence in FBO.

The first objective of this PhD thesis was to characterize virulence gene profiles of *C. perfringens* strains considering all *C. perfringens* virulence factors identified to date. The result revealed a considerable diversity, since 15 different virulence gene profiles were obtained from a collection of 146 strains implicated in 44 FBOs in the Paris region between 2013 and 2018. Heterogeneous virulence gene profiles from multiple strains isolated during the same FBO have been demonstrated in particular for the presence of the *cpe* gene. The results of virulence gene profiling also revealed cases in which *C. perfringens* was the only pathogen identified in the incriminated food, but none of the recovered strains was positive for the *cpe* gene, which brings into hypothesis that *cpe*- strains may be associated with FBO.

The second research objective was to perform a more detailed genomic analysis in order to identify genetic markers that characterize *C. perfringens* strains involved in FBOs. Phylogenomic reconstruction using core genome SNPs identified two distinct clades, with chromosomal *cpe*+ strains in one clade and plasmid *cpe*+ and *cpe*- in the other clade.

Comparative genomic analysis carried out on core genes identified 85 genes specific to *cpe*+ strains and 132 genes specific to *cpe*- strains. Pan- and core-genome analyses revealed the conservation of 6 % of the genome (core-genome) throughout the 146 strains, with a large and open pan-genome. This pan-genomic feature enables different strains to survive in diverse environmental niches.

Genome scanning for mobilome identified 5 different types of plasmids described as carrying toxins and antibiotic resistance genes. In relation to antibiotic resistance genes. Analysis of the resistome indicate the presence of *mprF* gene in 146 strains of the collection. Potential resistance to tetracycline (*tet(A)P* and *tet(B)P*) and to bacitracin (*bcr*) was identified indicating a risk of resistance among *C. perfringens* strains involved in FBOs.

Analysis of the mobilome identified the presence of phages in 73 % and CRISPR-Cas systems in 64 % of isolates studied. This high presence of phages results from the diversification of the host and the adaptation of *C. perfringens* to different ecological niches.

Finally, the third research objective was to characterize the cytotoxicity of *C. perfringens* strains *in vitro* in order to differentiate pathogenic from non-pathogenic strains. Cytotoxicity of strains was characterized in a relevant *in vitro* model after exposure of Caco-2 cells to vegetative *C. perfringens* supernatant. With the exception of six strains, very little cytotoxicity was observed in Caco-2 cells with vegetative *Clostridium perfringens* supernatants. This difference between the expected results and those obtained could be due to the inadaptability of the Caco-2 cell model which does not reflect the complexity of the intestine or due to the low production of toxins in bacteriological culture medium.

This work led to a better toxinic characterization of *C. perfringens* by determining virulence gene profiles at the genomic level by identifying mobile genetic elements and exploiting the cytotoxic potential of *C. perfringens* strains involved in FBO.

Keywords: Foodborne outbreak, *Clostridium perfringens* enterotoxin, virulence gene profiles, virulence factors, whole genome sequencing, cytotoxicity

Caractéristiques toxiques et diversité génétique des souches de *Clostridium perfringens* impliquées dans des TIAC en Ile-de-France

Clostridium perfringens représente le quatrième agent pathogène responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France et en Europe. La bactérie est classée en sept toxinotypes (de A à G), en fonction de la production de six toxines majeures (CPA, CPB, ETX, ITX, CPE et NetB). Le rôle de l'entérotoxine CPE, codée par le gène *cpe* dans les intoxications alimentaires, est bien établi. Cependant, 22 facteurs de virulence, comprenant des toxines et des enzymes hydrolytiques, ont été décrits dans la littérature. Leur impact sur l'étiologie des TIAC reste inconnu, d'autant plus que la méthode de référence utilisée afin de certifier la présence de *C. perfringens* dans les aliments impliqués dans des épisodes toxiques – à savoir la norme EN NF ISO 7937 – n'augure pas de leur pathogénicité. En outre, il n'existe pas de méthode de typage permettant de relier les souches de *C. perfringens* à des réservoirs particuliers ou encore à leur prévalence dans les TIAC.

Cette thèse avait comme premier objectif la caractérisation toxique d'une collection de 146 souches de *C. perfringens* impliquées dans des TIAC en région parisienne entre 2013 et 2018. Cette collection de souches est la plus vaste décrite pour les toxi-infections alimentaires. Pour cela, une étude des profils des gènes de virulence a été réalisée. Les résultats de la caractérisation toxique ont révélé une grande diversité génétique, puisque 15 profils différents ont été obtenus pour les 44 TIAC étudiées. Des profils hétérogènes ont été mis en évidence au cours d'une même TIAC, en particulier pour les souches possédant le gène *cpe*. De plus, des TIAC où uniquement des souches de *C. perfringens* *cpe*-négatif (*cpe*-) ont été identifiées, nous amènent à nous interroger sur l'implication exclusive de la CPE dans la survenue d'un épisode toxique.

Le deuxième objectif de mon travail était la réalisation d'une analyse génomique détaillée, afin d'identifier des marqueurs génétiques permettant de caractériser les souches de *C. perfringens* impliquées dans des TIAC.

Une reconstruction phylogénomique basée sur le polymorphisme nucléotidique (SNP) du core-génome a donné lieu à une séparation en deux clades, conduisant à distinguer, d'une part, des souches *cpe*-positif (*cpe*+) chromosomique et, d'autre part, des souches (*cpe*+) plasmidique et *cpe*-négatif (*cpe*-). L'analyse du pan-génome a révélé que *C. perfringens* est le pathogène le plus diversifié actuellement décrit avec un génome conservé ne représentant que 6% (core-génome) de la taille du génome. Cette caractéristique pangénomique lui permet une adaptation à diverses niches environnementales.

Une analyse comparative des gènes du core-génome des populations *cpe*+ et *cpe*- a abouti à l'identification de 85 gènes spécifiques aux souches *cpe*+ et de 132 gènes spécifiques aux souches *cpe*-.

Une caractérisation du mobilome a permis d'identifier 5 types de plasmides différents, décrits comme porteurs de gènes de toxines et de résistance aux antibiotiques. L'analyse du resistome indique la présence du gène *mprF* dans toutes les 146 souches de la collection. Une résistance potentielle à la tétracycline (*tet(A)P* et *tet(B)P*) et à la bacitracine (*bcr*) ont été mises en évidence indiquant un risque potentiel de résistance des souches impliquées dans les TIAC aux antimicrobiens. Notre analyse du mobilome a permis d'identifier des événements de transferts horizontaux par la présence de phages et du système CRISPR dans respectivement 73% et 63% des souches étudiées. Ce fort taux de phages résulte de la diversification de l'hôte et de l'adaptation du *C. perfringens* à différentes niches écologiques.

Enfin, cette thèse avait pour troisième objectif de caractériser les souches de *C. perfringens* en fonction de leur cytotoxicité dans un modèle *in vitro* afin de déterminer leur pouvoir pathogènes. A l'exception de six souches, l'étude de toxicité *in vitro* réalisée à partir des surnageants de formes végétatives sur des cellules Caco-2 a révélé très peu de cytotoxicité. Ces résultats pourraient être dus aux limites du modèle cellulaire Caco-2 qui ne reflète pas la complexité de l'intestin ou à la faible production des toxines dans les conditions de culture utilisées.

Ainsi, ces travaux ont permis de contribuer à améliorer la caractérisation toxique de *C. perfringens* en déterminant les profils de gènes de virulence, au niveau génomique par l'identification des éléments génétiques mobiles et en explorant le potentiel cytotoxique des souches de *C. perfringens* impliquées dans les TIAC.

Mots-clés : TIAC, *Clostridium perfringens*, entérotoxine, profils de gènes de virulence, facteurs de virulence, séquençage de génome complet, cytotoxicité