



HAL
open science

Rôle des flagelles dans la réponse inflammatoire au cours de l'infection par *Clostridioides difficile*

Hiba Chebly

► **To cite this version:**

Hiba Chebly. Rôle des flagelles dans la réponse inflammatoire au cours de l'infection par *Clostridioides difficile*. Bactériologie. Université Paris-Saclay; Université Libanaise, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ060 . tel-03989044

HAL Id: tel-03989044

<https://theses.hal.science/tel-03989044v1>

Submitted on 14 Feb 2023

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.

Rôle des flagelles dans la réponse inflammatoire au cours de l'infection par *Clostridioides difficile*

*Role of flagella in the inflammatory response during
Clostridioides difficile infection*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay et de l'université Libanaise

École doctorale n° 569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué - ITFA
École doctorale Sciences et Technologies, Université Libanaise
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche Micalis Institute (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech), sous la direction de **Imad KANSAU**, Professeur des universités et la co-direction de **Assem ELKAK**, Professeur des universités

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 Décembre 2022, par

Hiba CHEBLY

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Geraldine SCHLECHT-LOUF

Professeur des universités, HDR, Université Paris Saclay

Présidente

Nicolas RITEAU

Chargé de recherche CNRS, HDR, Université d'Orléans

Rapporteur & Examineur

Laurent BOYER

Professeur des universités, HDR, Université de Nice

Rapporteur & Examineur

Thomas HENRY

Professeur des universités, HDR, Université de Lyon

Examineur

Layale SAFA

Maître de conférences des universités, Université Libanaise

Examinatrice

Remerciements

Je remercie vivement la présidente du jury, Madame le Pr. Geraldine Schlecht-Louf, et les rapporteurs de cette thèse, Messieurs les Pr. Nicolas Riteau et Pr. Laurent Boyer, pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail. J'associe à ces remerciements Monsieur le Pr. Thomas Henry et Madame le Dr. Layale Safa pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail de thèse et pour avoir accepté de l'examiner.

Cette thèse conclut trois années de travail réalisé au sein de l'équipe BaPS « Bactéries Pathogènes et Santé » de l'Unité MICALIS, à la faculté de pharmacie de l'Université Paris-Saclay à Châtenay-Malabry, en cotutelle avec l'Université Libanaise au sein du « Laboratoire de valorisation des Ressources naturelles et produits de santé (LVRNPS) ». Je tiens à remercier l'Ambassade Française qui m'a donnée la chance d'avoir une bourse EXCELLENCE Eiffel pour ma 1^{ère} année de thèse, ainsi que le programme « ADI 2019 » (IDEX Paris-Saclay, ANR-11-IDEX-0003-02) qui a financé mes 2^{ème} et 3^{ème} années de thèse.

Je veux avant tout remercier Madame le Professeur Claire Janoir de m'avoir accueillie au sein de son équipe durant ces trois ans et de sa bienveillance constante tout au long de ces années. Je remercie également Monsieur le Professeur Assem Elkak de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire dans le cadre d'un contrat doctoral en cotutelle et pour le soutien qu'il nous apporte pour le projet.

Imad... Que faut-il faire pour te remercier et te dire pour exprimer ma gratitude ? Pendant ces trois années de recherche au sein de ce laboratoire, j'ai eu la chance d'être encadrée par un « prof » exceptionnel, unique, expérimenté, gentil, « cool » et très généreux. A chaque moment, tu étais là avec ton beau sourire pour me réconforter et m'aider à avancer. Sans toi, je n'aurais rien pu faire. Imad ne m'a jamais fait ressentir la barrière étudiant-professeur, mais, à l'inverse, il a été comme un père pour moi, surtout pendant la période de la perte de mon père 😊. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente, sa patience, son soutien illimité et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués, pour m'avoir appris à être moins « un jeune docteur » et plus autonome tout au long de ce travail de recherche. Je souhaite remercier également Madame Kansau, merci Anne.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité, les conseils pertinents, la bonne humeur et l'aide des deux chercheurs de notre équipe « FliC » : Cécile Denève-Larrazet et Jean-Christophe Marvaud. Je vous remercie infiniment, surtout pour vos conseils avisés et vos écoutes qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Vos énergies et vos

confiances ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous : une équipe unique, distincte par son esprit magnifique.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à une personne spéciale, Layale Safa. Dès le début de mon master, tu m'as apportée un soutien, une disponibilité, une écoute, une confiance illimitée. Tes connaissances, tes critiques et tes conseils constructifs m'ont permis de mener à bien ce travail. Les efforts que tu as faits pour moi et pour le projet, le temps que tu m'as donné et les conseils avisés... Un grand merci.

Je remercie infiniment Hussein Koubeissy, un membre distingué de l'équipe. La 1ère personne que j'ai rencontrée à mes premiers pas en Île-de-France. Je te remercie pour ton soutien, ton aide précieuse, ton encouragement et ta confiance. Je te souhaite une très belle continuation.

Un grand merci particulier à Thomas Candela. Merci, Thomas, pour ta disponibilité, ton aide informatique « surtout la 3ème année avec les problèmes de NextCloud 😊) et pour les bons moments qu'on a passés.

Je tiens à remercier Séverine Péchiné pour ses conseils, sa bonne humeur et sa gentillesse, son aide. Il ne faut pas oublier le petit radiateur électrique 😊. Un grand merci.

J'adresse de sincères remerciements à tous les membres du laboratoire : Alban Le Monnier, Sylvie Bouttier, Marie-Françoise Bernet-Camard, Anaïs Brosse, Heloise Coullon, Aurélie Baliarda, Cassie Ribeiro, aux virologistes Marion Lussignol et Eva Hernandez, ainsi qu'aux parasitologistes Sameh Obeid et Zineb Fechtali pour leur aide, leur bonne humeur, et pour leur gentillesse.

Un remerciement spécial à Sylvie Lambert, Rahma Kazi-Tani, à Sandra Hoys, et à Manuel Cerqueira. Merci pour votre disponibilité, votre aide et votre engagement. Je remercie également Myriam Gaudrillet, et Bruno Kalama pour leur aide et leur gentillesse.

Sans oublier l'ensemble des Jeunes Docteurs, Alexis, Pierre-Alexandre, Diane, Tania pour leurs aides, leurs encouragements et leurs soutiens, aux très bons et beaux moments qu'on a passés ensemble, surtout pendant les déjeuners de « Gras ». Je garderai un très bon souvenir de vous tous.

Et bien sûr ma sœur, ma camarade de route, ma belle amie, Jeanne. Nous avons eu des parcours parallèles dès le début de notre thèse, avec les présentations de la Journée de l'Ecole

Doctorale, les constructions de plasmides, les images *moches* de WB, avec la patinoire, les recettes des plats franco-libanais ☺ et les conférences internationales ! Et ce jusqu'à nos soutenances ce mois... Je te souhaite une excellente continuation. Un spécial merci à François.

Je remercie Claudine Deloménie et Valérie Nicolas. Merci pour votre disponibilité, vos précieux conseils, votre patience, et la passion que vous mettez à bien transmettre vos connaissances.

Je remercie infiniment Ali Nasrallah, Imane Malli, et Rayan Dakroub dont la rencontre est l'une des meilleures choses qui me soient arrivées en France. Merci encore à Mariam Abdel Sater, Abed Mohamad, Chouaib Omar, vous avez été une très belle compagnie. Un très grand merci à Emma Métairie, c'était un grand plaisir de te connaître. Merci pour ta gentillesse, et ta bonne humeur.

Les mots ne suffisent jamais pour exprimer l'attachement, l'amour, l'affection que je porte pour vous. Mes parents, votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondus. Mon père, merci pour tout ce que tu as fait ! Pendant ces années et après de grandes souffrances que tu as endurées, je t'ai perdu durant ma 1^{ère} année doctorale, rien à dire, ni à exprimer la souffrance du cœur, je t'aime beaucoup, du fond du cœur, tu es toujours dans mon cœur. Le plus grand merci revient à ma mère, la personne qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci maman pour chaque larme de tes yeux, merci maman pour chaque conseil, chaque câlin et chaque rêve partagé, ce travail n'est qu'un petit cadeau que je t'offre, merci mille fois Maman ! Merci à mon frère et ma sœur, la joie de mon cœur, vous êtes sans doute le meilleur cadeau de ma vie !

Enfin, un grand merci du fond du cœur à une personne qui compte énormément pour moi, qui m'a soutenue, écoutée et encouragée. Je n'oublierais jamais que ton apparition dans ma vie l'a merveilleusement changée. J'adresse ma plus profonde gratitude à Hussein Taha, mon amour : c'est à lui que revient un rôle de cette réussite. Je te remercie du fond du cœur de ta *patience*, ton soutien et ton amour infini. Tu es la source de tout le bien dans ma vie ♥.

Dédicaces

A mon inspiration : du fond du cœur, je vous dis un mot : Merci.

Merci d'avoir rendu ma thèse plus supportable et d'être là malgré la distance, distance qui devrait bientôt s'effacer.

Mes chers parents, mon frère et ma sœur

Mon amour infini

Ma petite Yasmine.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Introduction	7
Données bibliographiques	10
1 Les infections à <i>C. difficile</i> (ICD)	10
1.1 Généralités.....	10
1.2 Facteurs de risque des ICDs	11
1.3 Epidémiologie des infections à <i>C. difficile</i>	15
1.4 Traitement et prévention des ICD	18
1.5 Manifestations cliniques.....	30
1.6 Diagnostic des ICD	33
2 Pathogénicité de <i>C. difficile</i>	37
2.1 Généralités sur la physiopathologie des infections à <i>C. difficile</i>	37
2.2 Les déterminants de pathogénicité de <i>C. difficile</i>	41
2.2.1 Les spores.....	41
2.2.2 Les protéines de surface	44
2.2.3 Les flagelles.....	50
2.2.4 Les toxines de <i>C. difficile</i>	56
2.3 La réponse de l'hôte contre <i>C. difficile</i>	63
2.3.1 La réponse immunitaire innée contre <i>C. difficile</i>	63
2.3.2 La réponse immunitaire adaptative contre <i>C. difficile</i>	66
3 Les inflammasomes et l'immunité innée.....	68
3.1 Les récepteurs de la réponse immunitaire innée.....	68
3.1.1 Les Toll-like receptors (TLR)	68
3.1.2 Les Nod-like receptors (NLR).....	69
3.2 Voies de signalisation des inflammasomes	70
3.3 Les inflammasomes	71
3.3.1 L'inflammasome NLRP3	72
3.3.2 L'inflammasome NLRP1	75
3.3.3 L'inflammasome NLRP6	76
3.3.4 L'inflammasome NLRP7	77
3.3.5 L'inflammasome AIM2.....	78
3.3.6 L'inflammasome Pyrine	78
3.3.7 L'inflammasome NAIP	80
3.3.8 L'inflammasome NLRC4.....	81
3.4 Les effecteurs des inflammasomes.....	90
3.4.1 La protéine adaptatrice ASC	90
3.4.2 Les caspases	91
3.4.3 La gasdermine (GSDMD) et la pyroptose.....	94

3.4.4	Les interleukines pro-inflammatoires associées aux inflammasomes	95
3.5	Régulation des inflammasomes	98
3.5.1	La régulation transcriptionnelle des inflammasomes	98
3.5.2	La régulation transcriptionnelle des récepteurs/senseurs des inflammasomes	102
3.5.3	La régulation transcriptionnelle des caspases et de leurs cibles	104
3.5.4	La régulation post-traductionnelle des inflammasomes	108
Travaux personnels.....		110
I. Objectifs scientifiques		110
II. Publication.....		111
Discussion		134
Conclusion et perspectives		141
Références bibliographiques		145

Liste des abréviations

ADP : Adénosine Di-Phosphate

Agr : Accessory gene regulator

AIM2 : Absent in melanoma 2

ALR : AIM2 - like receptors

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AP-1 : Activator Protein 1

APAF1 : Apoptotic protease activating factor 1

ARC : Apoptosis repressor with CARD

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

ASK : Apoptosis signal-regulating kinase

ASID : Australian Society for Infectious Diseases

BIR : Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat

BMDM : Bone-marrow-derived macrophage

CAPS : Syndromes périodiques associés à la cryopyrine

CARD : Caspase activation and recruitment domains

Cbp : Collagen binding protein

CC-CARD : Coiled-coil-CARD

CCL : Chemokine (C-C Motif) Ligand

CDT : *Clostridioides difficile* Toxin

COX2 : Cyclo-oxygénase 2

Couche S : Couche de surface

CPM : Colite Pseudo-Membraneuse

CROPs : Combined Repetitive Oligo-Peptides

Cryo-EM : Cryo-microscopie électronique

CWP : Cell wall protein

DAA : Diarrhée Associée aux Antibiotiques

db : double brin

DAMP : Danger associated molecular pattern

DISC : Death inducing signaling complex

DD : Death Domain

EIA : Enzyme Immuno Assays
ELISA : Enzyme-Linked immunosorbent Assay
ERK : Extracellular-signal-Regulated Kinases
ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESCRT : Endosomal sorting complex required for transport
ERV : Entérocoque Résistant à la Vancomycine
FADD : Fas-associated protein with death domain
FAK : Focal Adhesion Kinase
Fbp : Fibronectin binding protein
FDA : Food and Drug administration
FIIND : Function to find domain
FMF : Fièvre méditerranéenne familiale
FMT : Transplantation de microbiote fécal
FZD : Frizzled
GBP : Guanylate-binding protein
GDH : Glutamate Déshydrogénase
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPX : Glutathion peroxydase
GSDMD : Gasdermine D
Gyr : Gyrase
HAMP : Homeostasis-altering molecular processes
HAP : Hook-associated proteins
HD : Hélicoïdal domain
HMW : High Molecular Weight
Hsp60 : Heat Shock Protein
IAP : Inhibitor of Apoptosis
ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule 1
ICD : Infection à *Clostridioides difficile*
ICE : Interleukin-1 Converting Enzyme
ICEBERG : Inhibitor of pro-caspase-1 activation, consists essentially of only a CARD
IDSA : Infectious Diseases Society of America
IκBs : Inhibiteur de κB

ILCs : Innate lymphoid cells
InVS : Institut de Veille Sanitaire
IRF : Interferon regulatory factors
ISGF3 : Interferon-stimulated gene factor 3
IRG : Immunity-related GTPases
IV : Intraveineuse
JNK : Jun N-terminal Kinase
Kb : kilobase
kDa : kilo Dalton
LPS : Lipopolysaccharide
LMW : Low Molecular Weight
LRR : Leucine-rich repeat
LSR : Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor
LT : heat-Labile toxin
MAPK : Mitogen-Activated Proteine Kinase
MARCK : Membrane-associated ring-CH-type finger
MCMV : Murine cytomegalovirus
MDP : Muramyl dipeptide
MEC : Matrice extracellulaire
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLSB : Macrolide-lincosamide-streptogramine B
MPP : Matrix MetalloProteinases
MSU : Monosodium urate
Mt : Mitochondrial
MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88
NAAT : Nucleic acid amplification test
NAIP : NLR family, apoptosis inhibitory protein
NBD : Nucleotide binding domain
NEK : NIMA-related kinase
NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
NK : Natural Killer
NHS : National Health Service

NLR : NOD-like receptor

NEMO : NF- κ B Essential Modifier

NOD : Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing

OMV : Outer membrane vesicles

ORF : Open Reading Frame

PA : Protective antigen

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

Panx1 : Pannexine-1

pb : paire de bases

P2X7 : P2 purinoceptor 7

PCR : Polymérase chain réaction

PKR : RNA-dependent protein kinase

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells

PNN : PolyNucléaires Neutrophiles

Pkc δ : Protein Kinase C Delta

PRR : Pattern Recognition Receptor

PS : PolySaccharide

Pseudo-ICE/COP : *Pseudo* Interleukin-1 beta Converting Enzyme/ Caspase Recruitment Domain

PYD : Pyrine

PITs : Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps

RIPK1 : Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactive oxygen species

SARM : Staphylocoque Résistant à la Méricilline

SARS- CoV-2 : Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

SDS-PAGE : Sodium Docecyl Sulfate - Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

SGT1 : Suppressor of the G2 allele of Skp1

SHARPIN : SHANK-associated RH domain interacting protein

SHEA : Society for Healthcare Epidemiology of America

SIN : Signalement des infections nosocomiales

SLP : Surface Layer Protein

SREBP1 : Sterol response element binding protein-1
STAT : Signal transducer and activator of transcription
TF : Transcription Factors
TSLP : Thymic stromal lymphopoietin
TABs : TAK1 Binding proteins
TAK1 : Transforming growth factor- β -Activated Kinase-1
TC : Test de cytotoxicité
Th1 : T helper 1 cells
TIC : Test Immunochromatographique
TIR : Toll-Interleukine 1 Receptor
TIRAP : TIR domain containing adaptor protein
TLR : Toll Like Receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor alfa
TIFA : TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain
TRAF6 : TNF Receptor-Associated Factor 6
TRAM : TRIF-related adaptor molecule
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRIM31 : Tripartite Motif Containing 31
UFC : Unité Formant des Colonies
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1
VO : Voie orale
WHD : Winged helix domain

Introduction

Introduction

Clostridioides difficile est une bactérie, de type bacille à Gram positif, anaérobie stricte, mobile et sporulée. Elle est considérée comme étant la première cause d'infections nosocomiales digestives dans les pays développés. La transmission de cet agent pathogène se fait par voie féco-orale et les facteurs de risque les plus importants sont l'antibiothérapie, l'âge avancé et l'hospitalisation. L'infection à *C. difficile* (ICD) peut se révéler asymptomatique ou se traduire par des symptômes allant d'une diarrhée, modérée à sévère, à une colite grave et potentiellement mortelle. L'augmentation des infections ces dernières années a été liée à l'émergence de différentes souches de *C. difficile* dites hypervirulentes et épidémiques telles que les souches de PCR-ribotype 027, *North American Pulsotype 1* et *Restriction endonuclease analysis BI* (027/NAP1/BI), ainsi que la souche de PCR-ribotype 078, souches particulièrement répandues dans les pays développés. L'incidence, la gravité, la mortalité et les coûts de soin de santé associés à l'infection à *C. difficile* ont globalement progressé dans le monde sur les vingt dernières années, faisant de cette bactérie une menace majeure pour la santé publique.

La pathogénèse de *C. difficile* est principalement médiée par l'action de deux toxines, la toxine A (TcdA) et la toxine B (TcdB). Toutefois, certaines souches produisent une troisième toxine, la toxine binaire, qui peut également contribuer à la pathogénicité de la bactérie. Ces toxines agissent au niveau de l'épithélium intestinal et induisent une cascade d'événements cellulaires qui entraînent une réponse inflammatoire et des lésions tissulaires.

D'autres facteurs interviennent dans le processus infectieux, parmi lesquels des adhésines, telles que les protéines de la couche S et la protéine Cwp66, qui jouent un rôle dans l'adhésion aux tissus hôtes et dans la colonisation bactérienne digestive. Ce processus de colonisation est un prérequis pour induire les lésions intestinales. En effet, *C. difficile* doit franchir la barrière de mucus, s'implanter et coloniser les cellules épithéliales et permettre ainsi aux toxines d'atteindre leurs cibles cellulaires. Ces événements contribuent à l'apparition des manifestations cliniques comme la diarrhée et la colite pseudomembraneuse. D'autres facteurs de virulence comme les flagelles, qui confèrent la mobilité et le chimiotactisme de la bactérie, contribuent aux différentes étapes de l'infection, dont l'adhésion aux cellules de l'hôte, l'invasion cellulaire, l'auto-agglutination et la formation de biofilms. Par ailleurs, les flagelles de *C. difficile* sont impliqués dans l'induction de la réponse inflammatoire intestinale. En effet, la protéine FliC, composant structurel majeur des flagelles, est reconnue par le récepteur Toll-like 5 (TLR5), qui est exprimé au pôle basolatéral des cellules épithéliales intestinales.

L'interaction FliC/TLR5 conduit à l'induction d'une réponse immunitaire avec l'activation des voies de signalisation cellulaire MAPK et NF- κ B, conduisant ainsi à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De même, des travaux précédents effectués dans notre laboratoire ont montré le rôle critique des flagelles de *C. difficile*, en association avec les toxines, dans le développement des lésions muqueuses dans un modèle murin conventionnel d'ICD.

Par ailleurs, il a été montré que les flagellines bactériennes sont capables d'interagir avec des récepteurs intracellulaires porteurs de séquences répétées riches en leucine de type NACHT (NLR, NOD-like receptor). L'activation de ces derniers par différents ligands, y compris les toxines bactériennes, les mitochondries lysées, les flagellines bactériennes et les acides désoxynucléiques, conduit à la formation de complexes cytosoliques connus sous le nom d'inflammasomes. Ces complexes entraînent l'activation protéolytique et le clivage de la pro-caspase-1 et de la Gasdermine D (GSDMD), entraînant la libération de cytokines. Récemment, le rôle de NLRC4 dans l'induction de l'inflammation intestinale a été mis en évidence suivant son activation par certaines bactéries, notamment *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri*, *Burkholderia thailandensis* et *Salmonella Typhimurium*. En effet, l'activation de l'inflammasome NLRC4 par les flagellines de ces bactéries contribuerait à la sécrétion de cytokines inflammatoires, à la suite du clivage de la caspase-1.

Dans ce travail, nous avons cherché à étudier l'interaction éventuelle de la flagelline FliC de *C. difficile*, bactérie extracellulaire, avec NLRC4, suite à l'internalisation de FliC dans les cellules épithéliales intestinales. Les résultats obtenus suggèrent que FliC, après internalisation, conduit à l'activation des inflammasomes NLRC4 et au clivage de la caspase-1 et de celui de la GSDMD, entraînant une régulation à la hausse de l'expression des gènes pro-inflammatoires et de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires.

Dans ce manuscrit, nous allons dans un premier temps présenter une revue de la littérature sur i) les infections à *C. difficile*, les déterminants de sa pathogénicité et son interaction avec l'hôte et ii) les inflammasomes, leur signalisation et leur régulation, en détaillant plus particulièrement l'inflammasome NLRC4. Nous décrirons ensuite nos travaux de recherche portant sur l'étude du rôle des flagelles de *C. difficile* dans l'activation de l'inflammasome NLRC4. Nous décrirons d'abord l'internalisation de FliC dans les cellules épithéliales intestinales par microscopie confocale, puis son rôle dans l'activation de la voie de signalisation médiée par des inflammasomes dans un modèle de cellules épithéliales intestinales humaines. Enfin, après une discussion, nous aborderons les conclusions et les perspectives de notre travail.

Données bibliographiques

Données bibliographiques

1 Les infections à *C. difficile* (ICD)

1.1 Généralités

C. difficile est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, mobile et sporulé. A la coloration de Gram, les bactéries apparaissent sous forme de bâtonnets violets, d'une taille moyenne de 0,5 μm de large et 3,0 μm de long. Chaque cellule peut produire une spore qui se présente sous une forme ovale (0,7 x 1,5 μm) au niveau de la région subterminale de la bactérie [1]. (Figure 1).

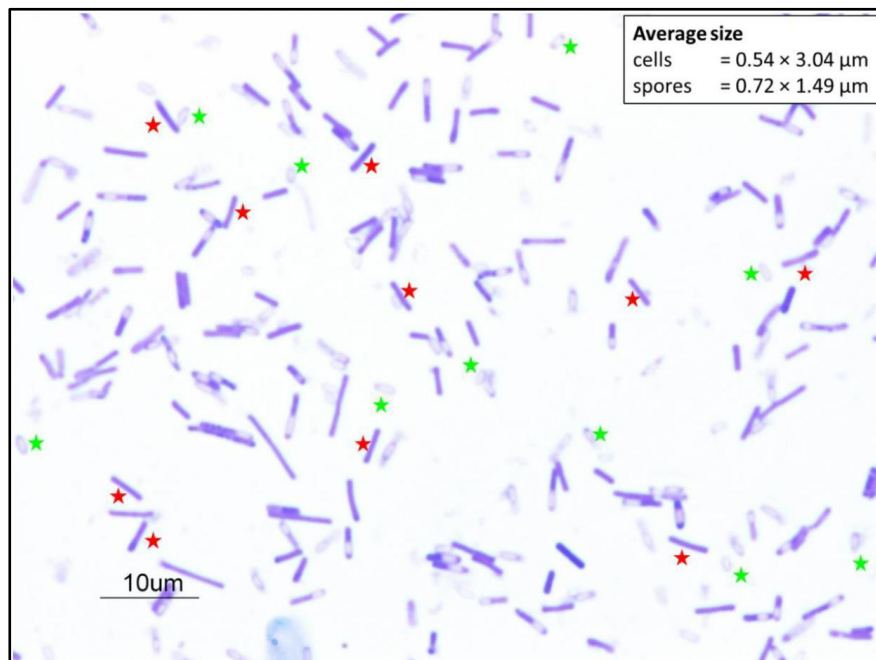


Figure 1 : Coloration de Gram de *C. difficile*. Dix cellules végétatives (★) et 10 spores (☆) ont été sélectionnées au hasard pour calculer la taille moyenne des cellules végétatives et des spores [2].

Les cellules végétatives sont métaboliquement actives et sensibles aux modifications environnementales. Sous cette forme, *C. difficile* se multiplie et présente toutes ses fonctions bactériennes. Toutefois, lorsque les sources de nutriments sont limitées ou lorsque l'environnement externe n'est plus adapté à sa survie, les formes végétatives produisent des spores via un processus appelé « sporulation ». Les spores de *C. difficile* sont métaboliquement inactives, résistantes aux modifications de l'environnement externe et peuvent survivre dans un environnement inapproprié pendant des siècles [3]. Lorsque des conditions plus favorables à sa

survie réapparaissent, les spores peuvent revenir à l'état végétatif en subissant un processus appelé « germination » [3,4].

C. difficile a été décrit pour la première fois en 1935 lorsque Hall et O'Toole isolèrent la bactérie dans des selles de nouveau-nés [5]. Ils l'ont nommé « *Bacillus difficilis* » à cause des difficultés rencontrées pour son isolement et pour sa culture *in vitro*. En 1938, elle a été classée dans le genre *Clostridium* et nommée *Clostridium difficile* [6]. Récemment, en 2015, Lawson et Rainey ont proposé de restreindre le genre *Clostridium* à *C. butyricum* et à ses espèces apparentées. D'après l'analyse de sa séquence du gène de l'ARNr 16S, *C. difficile* est apparue phylogénétiquement très éloignée de *C. butyricum* et des autres membres du genre *Clostridium* sensu stricto. Un nouveau genre, *Clostridioides*, a alors été proposé pour *C. difficile* qui se nomme désormais *Clostridioides difficile* [8].

Initialement, cette bactérie était considérée comme un commensal de l'homme, jusqu'à une étude qui a établi un lien entre la bactérie, la pathologie digestive et l'antibiothérapie, et a montré la présence d'une grande quantité de toxines dans les selles des patients atteints de colites pseudomembraneuses (CPMs). Ainsi, il a été suggéré que cette bactérie, présente en faible quantité dans l'intestin des sujets sains, était capable, dans certaines conditions, de se multiplier et de produire des toxines induisant à leur tour des diarrhées post-opératoires voire des CPMs [6]. En 1978, Bartlett et coll. ont établi un lien entre cette bactérie et les CPMs en montrant que l'isolement de *C. difficile* dans des selles des patients atteints de CPMs était associé au traitement à la clindamycine, à la présence des toxines dans les selles, mais également à la toxicité de l'isolat sur une culture *in vitro* [7]. Par ailleurs, il a été rapporté que le traitement par des antibiotiques pouvait modifier le microbiote intestinal et induire par la suite une susceptibilité à l'infection par *C. difficile* [8]. Une autre étude a montré que la vancomycine peut permettre l'élimination de *C. difficile* du colon, et que cette élimination est associée au rétablissement rapide des patients atteints de CPMs [9]. Enfin, dans les années 1990, *C. difficile* s'est vue considérée comme une bactérie pathogène, à la suite d'études qui ont révélé une forte augmentation des cas d'ICD dans les hôpitaux [10].

1.2 Facteurs de risque des ICDs

Les individus en bonne santé possédant un microbiote intestinal intact sont normalement résistants à *C. difficile*, alors que des perturbations du microbiote intestinal et une altération du

système immunitaire sont des facteurs de risque de développement d'une ICD [11]. Des études récentes ont révélé que la résistance ou la sensibilité aux ICD est multifactorielle et peuvent être affectées par la présence d'autres bactéries dans l'intestin qui favorisent ou inhibent la croissance de *C. difficile* [12,13]. En effet, les interactions entre *C. difficile* et le microbiote intestinal sont très complexes, mais quelques relations ont été démontrées au cours des dernières années. Ainsi, *Bacteroides thetaiotaomicron*, un membre important du microbiote intestinal utilisé dans les suppléments probiotiques, exprime l'enzyme sialidase qui clive l'acide sialique des mucines dans le mucus du côlon. *C. difficile* est capable d'utiliser l'acide sialique clivé comme source d'énergie [14]. De plus, des expériences réalisées *in vivo* sur un modèle murin ont démontré que la multiplication de *C. difficile* dans le côlon est favorisée lorsque les souris étaient colonisées à la fois par *C. difficile* et *B. thetaiotaomicron* par rapport à *C. difficile* tout seul. Ces données suggèrent que *B. thetaiotaomicron* est un mauvais choix de probiotique chez les patients infectés par *C. difficile*, car cette bactérie peut favoriser la croissance du pathogène dans le côlon de l'hôte [14,15].

Au contraire, un microbiote intestinal riche en bactéries de la classe Clostridia est souvent associé à la résistance à la colonisation par *C. difficile* chez l'hôte [16,17]. En effet, *Clostridium scindens*, une espèce génétiquement proche de *C. difficile*, est une bactérie qui confère une résistance à l'ICD [16]. Elle produit une enzyme qui convertit les acides biliaires primaires de l'intestin en acides biliaires secondaires. Normalement, la liaison des acides biliaires comme le cholate et le taurocholate aux récepteurs des spores de *C. difficile* favorise la germination des spores en formes végétatives [18,19]. Pourtant, *C. scindens* convertit le cholate d'acide biliaire primaire en désoxycholate, un acide biliaire secondaire qui inhibe la croissance des formes végétatives de *C. difficile*. Les membres des familles bactériennes Lachnospiraceae et Ruminococcaceae sont également associés à une résistance accrue à la colonisation par *C. difficile*, mais le mécanisme exact de cette protection n'a pas été déterminé [17]. Certaines espèces de ces familles peuvent également convertir le cholate en désoxycholate, de sorte que leur présence dans le microbiote peut inhiber la croissance de *C. difficile* en raison d'une concentration élevée de désoxycholate dans l'intestin [20,21].

En outre, l'âge est considéré comme un autre facteur pouvant affecter la gravité de l'ICD [22,23]. Les nourrissons présentent souvent un taux de colonisation très élevé de *C. difficile* dans les selles, aux alentours de 70 %, comparé à ~3 % chez les adultes [24,25]. Bien que de nombreuses souches de *C. difficile* isolées chez les nourrissons soient toxigènes, ceux-ci sont

généralement porteurs asymptomatiques de la bactérie [24]. Il a été proposé qu'une combinaison des anticorps anti-toxines dans le lait maternel et une incidence plus faible de récepteurs de liaison aux toxines de *C. difficile* pouvaient expliquer l'absence de symptômes chez les nourrissons [26,27]. Cependant, au cours de la dernière décennie, un nombre élevé de nourrissons atteints d'ICD symptomatique a été signalé. Ceci pourrait être lié à une augmentation de la prévalence des souches « hypervirulentes » de *C. difficile*, comme celles de ribotype 027 [25].

Contrairement aux nourrissons, les personnes âgées présentent, d'une part, des taux beaucoup plus élevés d'ICD et, d'autre part, un mauvais pronostic lors du diagnostic [28]. La gravité de l'ICD est également beaucoup plus élevée chez les personnes âgées et la plupart des décès dus à l'ICD surviennent chez les patients de plus de 65 ans [22,23]. L'augmentation de la gravité pourrait s'expliquer par la plus grande présence de comorbidités chez les patients âgés [29,30]. Par titre d'exemple, le dysfonctionnement du système immunitaire, beaucoup plus fréquent chez les patients âgés, est associé à des taux plus élevés d'infection à *C. difficile* [31]. Récemment, il a été démontré que la concentration élevée de calcium dans l'intestin favoriserait la germination des spores de *C. difficile* [32]. L'absorption du calcium étant réduite avec l'âge, il est donc possible que les taux de calcium élevés dans l'intestin des patients âgés augmentent leurs risques d'ICD, mais cela n'a pas été démontré expérimentalement [33,34]. Il existe également des changements liés à l'âge dans la composition du microbiote intestinal. Chez des patients âgés, une diminution de la diversité des bactéries anaérobies et une augmentation des espèces du *Clostridioides* ont été observées [35]. Ces modifications dans le microbiote pourraient également contribuer à la sensibilité accrue des personnes âgées aux ICD.

En dehors de l'âge et du microbiote, l'antibiothérapie est considérée comme le facteur de risque majeur des ICD. Les antibiotiques perturbent le microbiote intestinal, ce qui augmente le risque de colonisation par *C. difficile* et d'infection [36]. Des thérapies longues, des multithérapies et certaines classes particulières d'antibiotiques aggravent encore le risque d'ICD, en raison d'une perturbation importante du microbiote. Par exemple, plusieurs antibiotiques, ou classes d'antibiotiques, ont été identifiés comme facteurs de risque important d'ICD : clindamycine, carbapénèmes, pénicillines (à large spectre) et céphalosporines [37].

Les antibiotiques, ainsi que d'autres médicaments, associés au risque d'ICD sont présentés dans le tableau 1 [37].

Tableau 1. Facteurs de risque thérapeutiques, liés à l'hôte et cliniques associés à l'ICD [37].

Facteurs de Risque	
Antibiotiques	Autres médicaments
Clindamycine Carbapénèmes Céphalosporines (3e/4e gén.) Fluoroquinolones Pénicillines Céphalosporines (1ère/2ème gén.) Triméthoprim Sulfaméthoxazole Macrolides Aminoglycosides Daptomycine Tétracyclines Vancomycine	Antisécrétoires gastriques Antagonistes du récepteur de l'histamine-2 Inhibiteurs de la pompe à protons Autres Agents chimiothérapeutiques Médicaments anti-ulcéreux (non spécifiques) Anti-inflammatoires non stéroïdiens Corticostéroïdes Opiacés (utilisation lors du dernier épisode d'ICD)
Liés à l'hôte	Caractéristiques cliniques
Âge > 65 ans Maladie rénale chronique Diabète Cancer Diagnostic d'ICD précédent	Long séjour à l'hôpital Sonde d'alimentation nasogastrique Admission en unité de soins intensifs Procédures gastro-intestinales

La première méta-analyse évaluant le risque des antibiotiques, publiée en 1998, a révélé une association forte, et statistiquement significative, entre l'utilisation d'antibiotiques et l'ICD [38]. En effet, il a été montré que le risque d'ICD est 6 fois plus élevé en moyenne chez les personnes prenant une antibiothérapie que chez celles ne prenant aucun traitement antibiotique. La prise de clindamycine, de céphalosporines et de fluoroquinolones présente le risque le plus important d'ICD [39–41]. En milieu hospitalier, un traitement à base de clindamycine, céphalosporines, carbapénèmes, fluoroquinolones et triméthoprim/sulphonamides est associé à un risque au moins 2 fois plus élevé d'ICD, en comparaison avec des patients n'ayant pas eu d'antibiothérapie [41]. En milieu communautaire, ces antibiotiques sont associés à un risque plus élevé d'ICD, de 8 à 20 fois pour la clindamycine [39,40,42] et de 3 à 5 fois pour les céphalosporines et les quinolones [39]. Concernant les macrolides, ils sont associés à un risque d'ICD d'origine communautaire statistiquement significatif 2 à 3 fois plus élevé [39,40,42]. Des risques non significatifs ont été rapportés pour la tétracycline, que ce soit pour l'ICD d'origine communautaire ou hospitalière [39–41]. Il faut noter que l'association entre l'exposition aux antibiotiques et l'ICD d'origine communautaire a été rapportée plus fréquemment aux États-Unis qu'en Europe [39].

Des médicaments non antibiotiques peuvent également altérer le microbiote intestinal. Tout d'abord, les antisécrétoires gastriques diminuent la diversité du microbiote dans l'intestin, en augmentant le pH gastro-intestinal et en inhibant la croissance des bactéries bénéfiques intestinales. Plus précisément, les inhibiteurs de la pompe à protons interfèrent dans la composition du microbiote en limitant les pompes à protons bactériennes, et sont donc soupçonnés de favoriser davantage le risque d'ICD que les antagonistes des récepteurs de l'histamine 2 [43]. D'autres médicaments comme les agents anticancéreux, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les agents neutralisant l'acidité gastrique et les corticostéroïdes peuvent également augmenter le risque de développement d'une ICD [44]. Les opioïdes ont également été considérés comme des facteurs de risque d'ICD. Toutefois, ces derniers sont associés au développement de symptômes graves et de complications de l'ICD, telles que le mégacôlon toxique, lorsqu'ils sont pris au moment de l'infection, plutôt qu'à l'augmentation du risque de développement d'une infection initiale [37].

Outre les médicaments, certains facteurs liés à l'hôte, certaines comorbidités et les interventions liées aux soins peuvent également jouer un rôle dans le développement d'ICD. En dehors d'un âge avancé, parmi les facteurs les plus importants figurent une maladie grave, et un séjour prolongé à l'hôpital ou dans un établissement de soins [45].

1.3 Epidémiologie des infections à *C. difficile*

1.3.1 Données actuelles sur l'épidémiologie des ICD

Les ICDs constituent la première cause de diarrhée bactérienne nosocomiale dans les pays industrialisés et représentent 10 à 25 % des diarrhées post-antibiotiques et plus de 95 % des cas de colites pseudomembraneuses. Les ICDs sont associées à une mortalité qui varie de 0,6 à 1,5 % en cas de diarrhée simple, et de 24 à 38 % en cas de formes sévères [45–47].

De véritables épidémies d'ICD se sont développées, notamment en Amérique du Nord et en Europe, avec l'apparition de souches dites hypervirulentes ou épidémiques de ribotype 027, qui sont à l'origine de l'augmentation de l'incidence et de la mortalité associée aux ICD dans les pays développés [48]. Ainsi, les ICD ont présenté une augmentation de leur incidence au cours des 10 à 20 dernières années, avec l'apparition croissante d'infections en dehors des établissements de soins (communautaires) [49], en association avec une augmentation

importante de l'impact économique associé à l'ICD [10,50]. L'ICD a ainsi été identifiée comme une « menace urgente » en raison de l'augmentation récente de son incidence, sa gravité et sa mortalité en France. (Figure 2) [51].

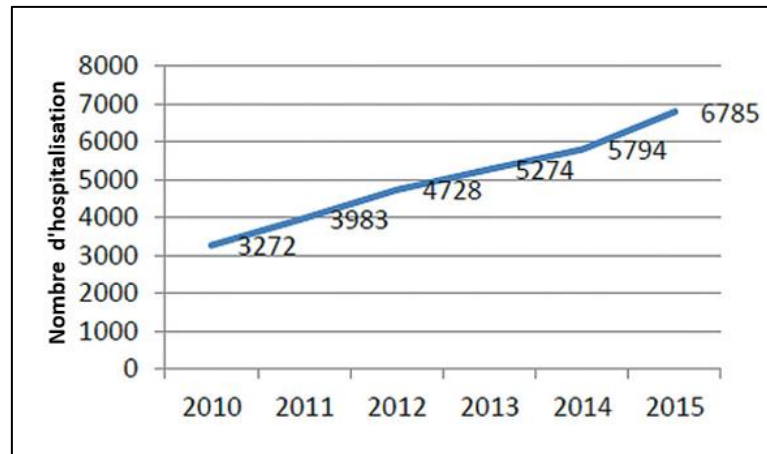


Figure 2. Nombre d'hospitalisation annuel pour infection à *C. difficile* en France [51].

Avant les années 2000, le nombre de cas d'ICD variait légèrement d'une année à l'autre. Cependant, au cours de la dernière décennie aux Etats-Unis, le nombre total de cas signalés a considérablement augmenté d'environ 25 % par an. Entre 1995 et 1999, l'incidence des ICD dans les hôpitaux de soins aigus aux États-Unis étaient stables, avec environ 30 à 40 cas pour 100 000 habitants. Une augmentation à 50 et 84 cas pour 100 000 habitants a été signalée respectivement en 2001 et 2005 [52]. En 2013, 13,7 cas pour 1 000 habitants ont été observés, avec un taux sept fois plus élevé chez les personnes âgées de 65 ans ou plus [51].

Au Canada, l'incidence est passée de 3 à 12 pour 1000 patients entre 1991 et 2002, et de 25 à 43 pour 1000 patients entre 2003 et 2004, avec une augmentation pour les cas sévères de 9,6 % à 25,2 % entre 1993 et 2003 et pour les cas résistants au traitement de 9,6 % à 25,7 % entre 2002 et 2004 [53]. Une tendance similaire a été observée en Europe où l'incidence des ICD a été estimée à 1,1 cas par 10 000 patients-jour en 2000 [54]. En 2008, cette incidence a augmenté à 4,1 cas pour 10 000 patients-jour [55]. Par ailleurs, en 2017, le centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC) a mené une étude sur les infections nosocomiales dans les centres hospitaliers de 33 pays européens, sur plus de 230 000 patients. Les résultats ont permis d'estimer une prévalence des ICDs de 3,7 %, alors que le nombre de cas d'ICD a été estimé à une moyenne de 123 997 cas par an (entre 61 018 et 284 857), avec une mortalité attribuable de 3 % (3 700 décès attribuables par an) [56]. L'incidence variait

largement selon les pays, pouvant aller de 12,2 cas pour 100 000 habitants en Espagne en 2007 [57], à 19,1 pour 100 000 habitants en Finlande [55]. L'incidence des ICDs est actuellement supérieure à celle des infections à staphylocoques résistants à la méticilline (SARM) [58]. En outre, de nombreux pays ont mis en place des lignes directrices visant à réduire les ICDs dans les établissements de soins aigus par le biais de la gestion des antibiotiques, de la gestion des épidémies, de la détection des cas et des précautions à prendre en cas de contact, de l'équipement de protection individuelle et du nettoyage de l'environnement. Ces mesures ont permis de réduire le nombre total de cas d'ICDs à l'échelle nationale. A titre d'exemple, le nombre total de cas est passé de 476 400 en 2011 à 462 100 en 2017 aux États-Unis et de 198 417 en 2009 à 150 500 cas en 2015 au Canada [59,60].

En France, en mars 2006, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a reçu le signalement de cas groupés d'ICD dans un établissement de santé du Nord de la France. Cet épisode a concerné 33 cas d'infections entre janvier et mai 2006 [61], d'après le signalement des infections nosocomiales (SIN), système d'alerte et de réponse précoce imposé à tous les établissements de santé depuis 2001. Sur la période d'étude effectuée en 2017, 23 012 SIN (100 658 patients) ont été rapportés, dont 7,1 % correspondant à des ICDs. Dans les hôpitaux de moyen et long séjour, l'incidence retrouvée était de 1,15 pour 10 000 patients-jour, dont 3 % présentant un état d'infection sévère avec un taux de mortalité de 2 % [62]. En 2009, l'incidence des ICDs a atteint 2700 cas pour 100 000 antibiothérapies, dont 14 % correspondant à des formes sévères de la maladie, et 1,15 pour 10 000 patients-jour, dont 2 % de formes sévères [63,64]. Cette incidence dans les établissements de santé est estimée entre 0,5 et 3 cas pour 10 000 patients-jours en 2015 [65].

1.3.2 Mortalité associée aux ICD

Au Canada, une augmentation de décès liés aux ICDs a été observée entre 1984 et 2000 avec 15,3 % de plus de décès par ICD en 2000 [66]. La mortalité associée aux ICD a subi une forte augmentation estimée à 400 % entre les années 2000 et 2017 [67]. En Angleterre, l'ICD a été signalée comme la principale cause de décès chez 499 patients en 1999 ; ce nombre est passé à 2 998 en 2005 et à 3 933 en 2007 [68]. L'épidémie de 2003 au Québec a été quant à elle marquée par une incidence multipliée par quatre, passant de 22,2 et 25,2 cas d'ICD pour 100 000 habitants, respectivement en 1991 et 2002, à 92,2 pour 100 000 en 2003 [69]. Cette épidémie a été associée à une mortalité importante atteignant 6,9 % des cas d'ICD et 7,5 % des

cas supplémentaires où l'ICD a été considérée comme facteur contributif [70]. Aux Etats-Unis, l'ICD est associée à 15 000 à 30 000 décès par an [60]. Une étude récente a rapporté que l'ICD est une cause d'infection nosocomiale chez les patients ventilés mécaniquement en soins intensifs (6,6 % d'une cohorte totale de 5 852 patients) et que le choc septique est survenu chez 34,7 % des patients. Pour les patients atteints d'ICD, le taux de mortalité était élevé (25,1 %) chez ceux en hospitalisation prolongée (23 j vs 15 j ; $p < 0,001$) et en soins intensifs (12 j vs 8 j ; $p < 0,001$), avec un besoin de soins qualifiés ou de suivi de réadaptation à la sortie de l'hôpital [71]. En France, l'ICD est considérée comme une cause attribuable de mortalité dans 1 % des cas et une cause contributive dans 4 % des cas qui décèdent un mois après l'infection [64]. La mortalité globale de l'infection à *C. difficile* varie de 2 à 6 % mais la mortalité est nettement plus élevée chez les patients souffrant d'une maladie intestinale inflammatoire et chez ceux qui sont admis dans les unités de soins intensifs [59].

1.4 Traitement et prévention des ICD

Après le diagnostic d'une ICD, les premières mesures doivent inclure l'évaluation de la possibilité d'arrêt de l'antibiotique en cause, ce qui pourrait suffire à la guérison des ICDs dans 25 % des formes simples [72]. En l'absence de facteur de risque et dans le cas des formes simples d'ICD, le médecin peut attendre le rétablissement clinique spontané pendant 48 heures sans initier un traitement spécifique. Néanmoins, l'observation attentive de l'état clinique et des paramètres de laboratoire (par exemple, numération leucocytaire, CRP, albumine sérique, créatininémie) est nécessaire pour minimiser le risque de détérioration soudaine [73,74].

Les formes sévères (forme fulminante ou compliquée) surviennent en général en cas d'hypotension, de choc, d'iléus ou de mégacôlon. Les patients qui ne répondent à aucun critère de gravité mais âgés de plus de 65 ans ou ayant des comorbidités importantes peuvent évoluer vers une forme d'infection très compliquée. Le traitement de l'ICD dans ce cas comprend un traitement spécifique pour *C. difficile*, ainsi que des mesures générales, telles que le retrait ou le changement des antibiotiques, un sevrage de certains médicaments, comme les inhibiteurs de la pompe à protons, compte-tenu de leur lien à l'augmentation du risque de récives, ou les médicaments qui affectent la motilité intestinale, comme le lopéramide et les opiacés [75,76].

1.4.1 Traitement antibiotique

Les principaux antimicrobiens recommandés pour le traitement de l'ICD comprennent le métronidazole, la vancomycine et la fidaxomicine [77–79]. Récemment, le métronidazole a

été retiré des recommandations de la IDSA et de la SHEA en raison de son moindre efficacité, par rapport à la vancomycine particulièrement au cours des ICD sévères [77,78], mais cet antibiotique reste dans les recommandations de l'ESCMID [80], ainsi que dans les lignes directrices mises à jour par la « *Australian Society for Infectious Diseases* » (ASID) [79]. En plus de ces antimicrobiens, plusieurs agents ont été développés pour le traitement des ICDs, certains d'entre eux (Ridinilazole) étant actuellement en cours d'essais cliniques [81,82].

Le métronidazole appartient à la classe des nitroimidazolés. Il est activé par une réaction réductrice au sein de la cellule, qui se traduit par l'accumulation de radicaux libres, qui déstabilisent l'ADN et tuent les bactéries [83]. C'est un agent antimicrobien à large spectre qui est efficace contre diverses bactéries anaérobies [84]. Comparativement à la vancomycine et à la fidaxomicine, le métronidazole est un antibiotique privilégié pour le traitement de l'ICD en France et dans les pays en développement. Son spectre d'action présente cependant un inconvénient, car il inhibe également diverses bactéries du microbiote intestinal, empêchant ainsi le rétablissement d'un microbiote intestinal sain [85]. Initialement, le métronidazole était considéré comme un médicament moins efficace que la vancomycine pour le traitement des ICDs [86]. En effet, des études récentes suggèrent que le métronidazole pourrait être moins efficace dans les cas d'ICDs modérées et sévères [87].

La vancomycine est un antibiotique glycopeptidique. Il cible le dipeptide D-Ala-D-Ala, faisant partie des sous-unités du peptidoglycane, et inhibe la synthèse de la paroi bactérienne [88]. La vancomycine est hautement efficace contre les bactéries à Gram positif et un antibiotique de choix pour le traitement des infections contre les bactéries à Gram positif résistantes aux antibiotiques, telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA) [89]. Généralement, la vancomycine est administrée par voie parentérale en raison de sa faible biodisponibilité [88]. Pour le traitement des ICDs, la faible biodisponibilité orale de la vancomycine est un avantage, puisqu'elle peut être administrée par voie orale, tout en conservant une concentration élevée dans la lumière colique avec moins d'effets indésirables systémiques. La vancomycine possède également une activité limitée contre les agents protecteurs du microbiote intestinal, contrairement au métronidazole [90]. L'inconvénient majeur du traitement à la vancomycine est l'augmentation du risque de développement de résistance à la vancomycine par les *Enterococcus* suite au traitement [91,92].

La fidaxomicine est le premier membre du groupe macrocyclique des antibiotiques. Elle est spécialement utilisée pour le traitement des ICDs et possède de nombreux avantages, telles qu'une faible biodisponibilité orale et une activité limitée contre le microbiote intestinal [93,94]. Comparativement à la vancomycine, la fidaxomicine est associée à moins de récurrences après le traitement. Elle est actuellement recommandée par l'IDSA et la SHEA comme un traitement de première intention pour tous les cas d'ICDs chez les patients adultes [95,96].

En plus de ces trois principaux antibiotiques, d'autres agents antibactériens ont été évalués pour le traitement des ICDs. La rifaximine est un antibiotique proche de la famille de la rifampicine, qui a été modifiée pour avoir une faible biodisponibilité orale, limitant son effet systémique [97]. Une étude a montré que sept patients sur huit ont guéri sans récurrence après 2 semaines de traitement à la rifaximine [98]. Le cadazolide, très similaire au linézolide, est aussi un agent spécialement conçu pour le traitement des ICDs. Contrairement à la rifaximine et à la rifampicine, il n'existe pas de résistance croisée entre le cadazolide et le linézolide [99,100]. Néanmoins, les essais cliniques de phase 3 ont montré que le cadazolide a une efficacité inférieure à celle de la vancomycine et son avenir dans le traitement des ICDs est désormais incertain [81].

1.4.2 Anticorps monoclonaux

Le suivi des patients ayant subi une ICD a permis de mettre en évidence que ceux capables de produire des anticorps contre les toxines de *C. difficile* sont moins susceptibles de développer une récurrence [101]. Cette observation a conduit au développement d'anticorps monoclonaux contre les toxines TcdA et TcdB de *C. difficile* comme moyen de prévention des ICDs. Cependant, seul l'anticorps monoclonal anti-TcdB a été commercialisé sous le nom de bezlotoxumab [102].

1.4.3 Autres traitements médicaux de l'ICD

Compte-tenu des limites de l'antibiothérapie dans le traitement des ICDs, il a été suggéré que les approches non antibiotiques pour le traitement pourraient donner de meilleurs résultats. Le bezlotoxumab en est un exemple réussi [102], bien qu'il ne soit utilisé que pour la prévention des récurrences et non pour le traitement des ICDs [77,78]. Le Tolevamer est un autre composé testé dans ce contexte. C'est un grand polymère soluble qui lie et neutralise les toxines de *C. difficile in vitro* [103]. Ce polymère ne présente pas de propriétés antimicrobiennes et ne devrait

pas interférer avec la récupération d'un microbiote intestinal sain. Cependant, un essai clinique randomisé a rapporté que le Tolevamer est nettement moins efficace que la vancomycine et le métronidazole ($p < 0,01$). Ainsi, il n'était pas approuvé comme un traitement des ICDs [87].

1.4.4 Transplantation de microbiote fécal

L'altération du microbiote intestinal sain est la clef de voûte de la pathogenèse des ICDs. La transplantation de microbiote fécal (FMT) a été proposée comme un moyen de restaurer le microbiote intestinal chez les patients atteints d'ICD [104]. Cette approche est recommandée chez les patients présentant de multiples récurrences [78]. La FMT a une efficacité élevée, puisque 13% de patients développent des récurrences et nécessitent une deuxième transplantation [105]. Toutefois, la FMT présente un risque potentiel élevé de transmission d'agents pathogènes des donneurs aux receveurs, comme, par exemple, la transmission potentielle du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS- CoV-2) [106]. Pour minimiser ce risque, des protocoles de dépistage de pathogènes potentiels sur des matières fécales doivent être appliqués dans les centres de santé dispensant des FMT [104–106].

1.4.5 Intervention chirurgicale pour ICD

Bien que la plupart des cas d'ICD puissent être prises en charge médicalement par les méthodes décrites ci-dessus, certains patients peuvent développer des complications graves nécessitant une intervention chirurgicale [107]. L'intervention chirurgicale de référence est la colectomie, qui implique l'ablation de la partie infectée du tissu colique par *C. difficile* [77,79]. Il est suggéré que l'identification rapide des patients nécessitant la chirurgie et l'intervention précoce peuvent considérablement améliorer les résultats postopératoires [107].

1.4.6 Autres stratégies de traitement et de prévention

Plusieurs stratégies de traitement et de prévention des ICD sont en cours d'élaboration. Des études préliminaires ont suggéré que les souches non-toxinogènes peuvent empêcher la colonisation des souches toxinogènes. Ceci a permis de suggérer que les souches non-toxinogènes pourraient servir de mesure préventive contre les ICDs en transférant tout le contenu fécal, comme dans la FMT, de patients porteurs de souches non toxinogènes vers des patients présentant une infection par une souche toxinogène [108]. Cette stratégie permettrait d'administrer des espèces bactériennes protectrices dans l'intestin [109].

Concernant la prévention des ICDs, des stratégies vaccinales sont actuellement à l'étude. Des vaccins contre les toxines de *C. difficile* ont été développés et ont montré une protection contre l'effet toxique sur l'épithélium intestinal et les signes cliniques associés [110,111]. Malheureusement, Sanofi a arrêté récemment le développement de ces vaccins probablement à cause d'une faible efficacité. En revanche, en mars 2022, Pfizer a annoncé les résultats de l'essai CLOVER (*CLO*stridium *difficile* Vaccine Efficacy TRial), une étude de phase 3 évaluant son candidat vaccin contre *C. difficile* (PF-06425090) dans la prévention de l'ICD. Les analyses initiales ont indiqué un bénéfice très favorable dans la réduction de la gravité de l'ICD [112] D'autres approches vaccinales ciblant les facteurs de colonisation de *C. difficile* ont été également étudiées et ont montré une protection partielle contre la maladie [113,114].

1.4.7 Recommandations thérapeutiques

i. Traitement d'un premier épisode des ICDs

Le traitement de choix pour le premier épisode d'ICD est la vancomycine [115]. La posologie recommandée est de 125 mg toutes les 6 heures par voie orale (PO) ou par sonde nasogastrique. La vancomycine est commercialisée en gélules de 250 mg. Cette forme est peu disponible et coûte plus cher que la forme intraveineuse (IV) [116]. La solution reconstituée est stable au réfrigérateur plus de 14 jours [117].

Le métronidazole a été utilisé pour le traitement des ICD bénignes. Cependant, les directives IDSA 2018 [118] ne le recommandent pas sur la base des résultats de deux études randomisées qui ont montré la supériorité de la vancomycine par rapport au métronidazole en termes de guérison clinique mais aussi concernant le taux des récurrences [86,87]. La posologie du métronidazole est de 500 mg toutes les 8 heures par voie orale. Le métronidazole peut être utilisé par voie intraveineuse (500 mg toutes les 8 h) si la voie orale est inutilisable et pour les cas graves puisque le médicament est excrété par la bile, atteignant des concentrations fécales thérapeutiques. La dose de métronidazole doit être diminuée de moitié (250 mg/8 h) en cas d'insuffisance hépatique ou rénale sévère (clairance de la créatinine < 10 mL/min). Contrairement à la vancomycine prise par voie orale, l'absorption du métronidazole est élevée, avec un risque accru d'effets systémiques indésirables, généralement traduits par une intolérance digestive. Les traitements prolongés ne sont pas recommandés avec le

métronidazole en raison du risque de neurotoxicité. Il est également contre-indiqué chez la femme enceinte (premier trimestre) et en période d'allaitement [119].

La fidaxomicine est un antibiotique macrocyclique non résorbable qui agit en inhibant l'ARN polymérase bactérienne. Cette molécule a montré un taux de récurrences inférieure à celui obtenu avec la vancomycine, avec un taux de guérison similaire. C'est pourquoi il n'est considéré comme un traitement initial des ICD [120–122]. Un autre inconvénient de cette molécule est son prix plus cher que celui de la vancomycine, même si certaines études ont montré sa rentabilité [123,124]. La posologie de la fidaxomicine est de 200 mg toutes les 12 heures par voie orale. La durée du traitement pour un premier épisode des ICD est de 10 jours. Dans les cas où il y ait une amélioration clinique mais sans résolution complète des symptômes, la durée peut être prolongée jusqu'à 14 jours [77].

ii. Traitement des ICD fulminantes

Le traitement de choix est la vancomycine à posologie plus élevée, 500 mg toutes les 6 heures par voie orale, associée à une dose de 500 mg de métronidazole IV toutes les 8 heures [77]. Cette stratégie diminue la mortalité des cas des ICD fulminantes [125]. Si le patient ne répond pas à l'association vancomycine/métronidazole, d'autres traitements peuvent être proposés, tels que la fidaxomicine et les immunoglobulines IV. Cependant, l'efficacité de ces traitements n'a pas été validée par des essais cliniques. Comme indiqué précédemment, dans certains cas, une intervention chirurgicale est nécessaire et une colectomie subtotale avec préservation du rectum serait recommandée [126].

iii. Traitement des récurrences

Environ 25 % des patients traités par la vancomycine présentent une récurrence, chaque récurrence augmentant le risque de survenue d'une nouvelle récurrence [127]. Les patients âgés de plus de 65 ans avec des comorbidités nécessitant un traitement antibiotique sont plus susceptibles de présenter un nouvel épisode d'ICD. Avant un deuxième épisode, deux stratégies de traitement sont souvent proposées : un traitement de courte durée (10-14 jours) ou un traitement de longue durée. La première stratégie nécessite l'utilisation de la fidaxomicine, qui réduit le risque de présenter de nouvelles récurrences [127]. La seconde stratégie consiste à utiliser la vancomycine, soit avec une diminution des doses ou avec une administration toutes les 72 heures pendant 4 à 6 semaines. Le traitement à dose faible de vancomycine consiste à administrer PO une dose de 125 mg toutes les 6 heures pendant 10 à 14 jours, suivie de 125 mg

toutes les 12 heures pendant une semaine, 125 mg par jour pendant une semaine, 125 mg toutes les 48 heures pendant une semaine et enfin 125 mg toutes les 72 heures pendant deux semaines [77]. Pourtant, ces recommandations sont actuellement en cours de réévaluation [128]. Dans le but de mettre au point le traitement optimal des ICDs récurrentes, une étude multicentrique incluant 86 hôpitaux Européens avec des patients âgés de plus de 60 ans présentant, soit avec un premier épisode d'ICD, soit en récurrence a montré une supériorité d'un traitement prolongé à la fidaxomicine (200 mg toutes les 12 heures durant 5 jours, puis 200 mg tous les deux jours pour une durée de 7 à 25 jours) par rapport au traitement conventionnel à la vancomycine (125 mg toutes les 6 heures pendant 10 jours) [129].

iv. *Résistance de C. difficile aux antibiotiques*

C. difficile n'est que rarement résistante aux antibiotiques utilisés pour le traitement des ICDs [130]. Cependant, de nombreux cas de résistance de *C. difficile* au métronidazole et à la vancomycine, et d'échec au traitement antibiotique, ont été rapportés dans différentes régions du monde ces dernières années. Aux États-Unis, entre 2007 et 2011, 13 % des souches testées étaient résistantes au métronidazole [131]. En Europe, une surveillance longitudinale de la résistance aux antibiotiques des ribotypes prévalents de *C. difficile* a montré que 0,11 % des souches testées étaient résistantes au métronidazole et 2,29 % résistantes à la vancomycine [132].

Cependant, une résistance naturelle à de multiples autres antibiotiques (dont les pénicillines, les céphalosporines, les aminoglycosides, la clindamycine, les fluoroquinolones) permet à *C. difficile* de survivre à leur exposition alors que le microbiote intestinal protecteur périt [133]. De nombreuses études ont décrit l'association entre la résistance aux antibiotiques et l'apparition des ICDs, infections alors causées par des souches de *C. difficile* résistantes aux médicaments [134–136]. A titre d'exemple, la résistance des souches épidémiques 027 est considéré comme l'un des facteurs impliqués dans leur émergence et leur propagation en Amérique du Nord, en Europe et dans le monde [137].

Les mécanismes de résistance documentés à plusieurs classes d'antibiotiques sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2. Résumé des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *C. difficile*.

Antibiotiques	Mécanismes de résistance	Déterminants génotypiques
Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire		
Pénicillines/céphalosporines	Résistance intrinsèque due à la classe D de bêta-lactamase	<i>cdd1</i> and <i>cdd2</i> [138]
β-lactamines/inhibiteurs de β-lactamases	Inconnu/aucune preuve de résistance	N/A
Carbapénèmes	Altération de liaison de la pénicilline aux protéines PBP 1 et 3	<i>pbp1</i> et <i>pbp3</i> [†] [139]
Monobactames	Résistance intrinsèque	N/A
Glycopeptides	Altération du dipeptide D-Ala-D-Ala	<i>vanB</i> [140]
Inhibiteurs de la synthèse des protéines		
Aminoglycosides	Résistance intrinsèque	
MLS _B	Méthylation de l'ARNr 23S Mutation ponctuelle sur l'ARNr 23S Troncation des protéines ribosomales L4 et L22	Gènes de classe <i>erm</i> (<i>erm</i> (B)) ARNr 23S [†] <i>rplD</i> et <i>rplV</i> [141]
Tetracyclines	Production de protéines protectrices	Gènes de la famille <i>tet</i> (<i>tetM</i> , <i>tetW</i>) [141]
Oxazolidinones	Méthylation de l'ARNr 23S Altération de la protéine ribosomique L3	<i>cfr</i> [142] <i>rplC</i> [†] [99]
Phénicols	Enzymes modificatrices de médicaments	Gènes de la famille des chats (<i>catD/catP</i>) [141]
Agents ciblant les acides nucléiques		
Fluoroquinolones	Altération de l'enzyme gyrase	<i>gyrA</i> and <i>gyrB</i> [†] [143]
Rifamycines	Altération de l'enzyme ARN polymérase	<i>rpoB</i> [†] [141]
Nitroimidazoles		pCD-METRO plasmid [144]
Agents de ciblage de la membrane cellulaire		
Daptomycine	Inconnue	N/A
Polymyxines	Résistance intrinsèque	N/A

MLS_B, antimicrobiens macrolide-lincosamide-streptogramine B

[†]mutations sur les gènes chromosomiques.

1.4.8 L'impact économique des ICD

Le surcoût financier lié aux ICD est significatif pour les établissements de santé. En effet, une épidémie à *C. difficile* peut entraîner la mise en place de mesures spécifiques d'hygiène et/ou d'isolement, la fermeture temporaire des services impliqués, ainsi qu'une augmentation de la durée d'hospitalisation [145]. En Europe, l'augmentation de l'incidence et de la sévérité des ICD suite à l'émergence des clones épidémiques, en particulier des souches de ribotype 027, a été accompagnée d'une augmentation des coûts des soins [146] (Figure 3).

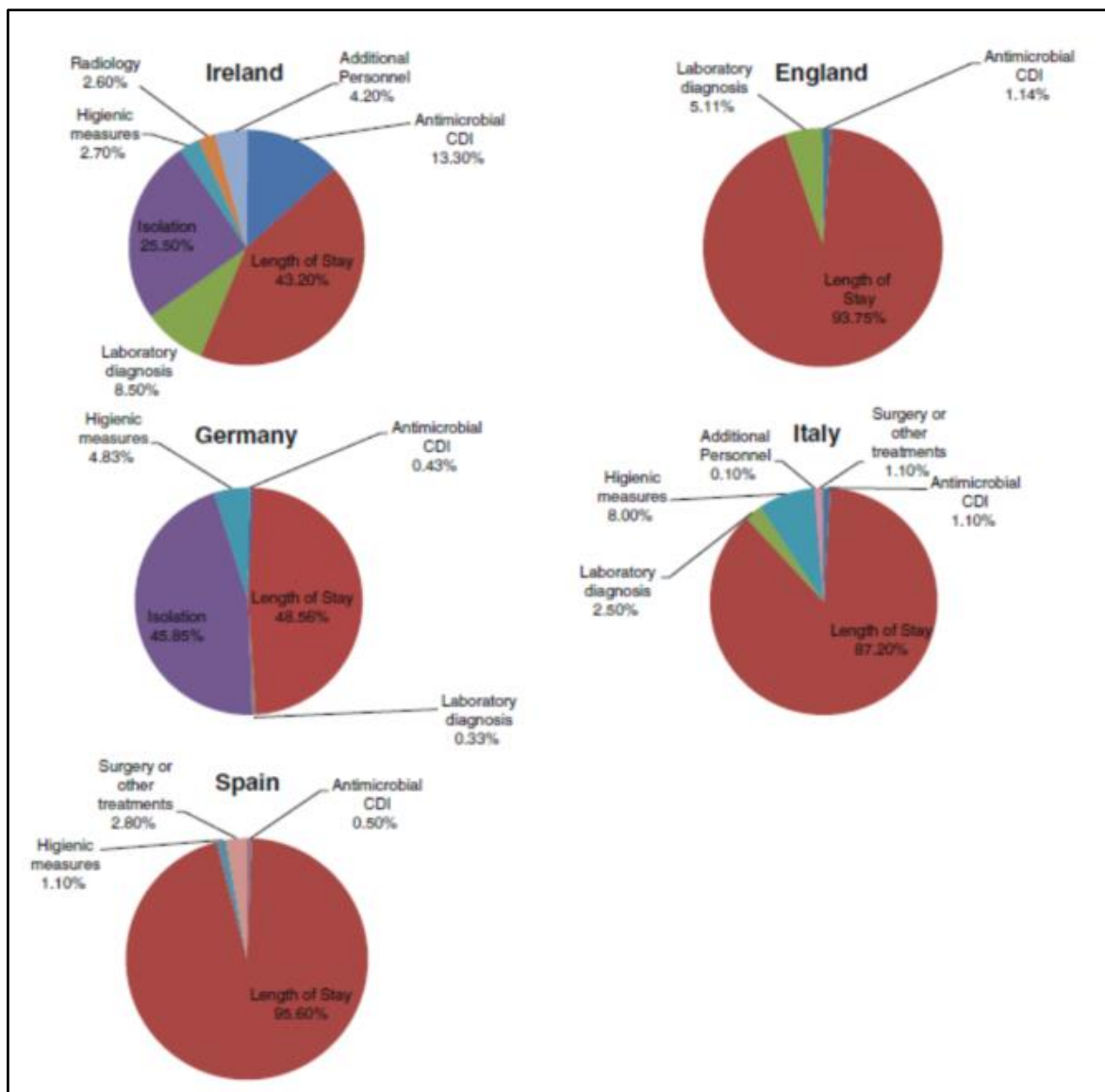


Figure 3. Répartition des coûts des infections à *C. difficile* dans certains pays d'Europe. Le coût des ICD est principalement lié à la durée d'hospitalisation dans tous les pays européens faisant part de l'étude. En revanche, et d'une manière intéressante, le coût des antibiotiques utilisés pour le traitement des ICD ne représente que 1 % en moyenne du coût total de l'infection, sauf en Irlande où ce coût atteint 13,3 % du coût total. Les autres coûts des ICD sont liés à plusieurs autres mesures dont l'isolement des patients, le diagnostic, les mesures d'hygiène et les interventions chirurgicales [147].

Selon les estimations, le coût des traitements associés aux ICD en Amérique du Nord s'élèverait à 3,2 milliards de dollars (\$) pour les systèmes de santé [148]. Aux États-Unis, le fardeau économique annuel des ICDs sur le système de soins de santé est estimé à près de 4,8 milliards de dollars par an en coûts excédentaires dans les établissements de soins aigus, avec un coût moyen de 24 400 \$ par cas [146,149]. La plupart de ces coûts a été attribuée à des épisodes primaires d'ICD, avec un coût de 12 607 \$ par cas [150]. En Europe, les coûts d'ICD sont estimés, en général, entre 5 798 et 11 202 euros (€) par cas, mais les données ne sont disponibles que pour six pays Européens (Irlande, Angleterre, Allemagne, Espagne, France et Italie) [151].

Une étude en 2017 au Royaume-Uni estime que le coût moyen du traitement d'un patient atteint d'une ICD est à 7 500 livres Sterling (£) (8 600 € environ), contre 2 800 £ (3 200 € environ) pour les patients souffrant d'autres maladies. Selon le « National Health Service » (NHS) en Écosse, une étude effectuée sur une période d'un an, s'étalant entre octobre 2015 et octobre 2016, a permis d'estimer un coût de 8 650 000 £ pour le traitement de 1 150 patients âgés de plus que 15 ans ayant une ICD. De plus, les coûts supplémentaires, ainsi que le coût de base d'un lit d'hôpital et de soins médicaux normaux, ont augmenté le coût total de traitement à 1 955 000 £ [152]. En Angleterre, les coûts d'ICD estimés oscillent entre 5 000 et 15 000 € par cas [119]. En France, le surcoût varie de 1 666 à 5 867 € par cas d'ICD [153]. Dans une étude de Le Monnier *et al.*, le surcoût lié aux rechutes d'ICD est estimé à 7 514 € par cas (9,5 millions d'euros en 2011 dans les 12 hôpitaux concernés dans l'étude), ce qui est équivalent à 12,5 % du coût d'ICD total estimé dans cette étude [154]. Ces coûts élevés sont en grande partie liés à la nécessité d'isolement des patients, à un traitement coûteux, et à la prolongation des durées de séjours hospitaliers. En effet, le surcoût lié à la prolongation de la durée d'hospitalisation représente entre 43,2 et 95,6 % du coût total des ICD (Figure 3) [147].

1.4.9 Distribution des ribotypes de *C. difficile* en Europe

L'étude européenne sur l'infection à *C. difficile* et l'étude EUCLID sont deux grandes enquêtes européennes visant à décrire l'épidémiologie de l'ICD, y compris la prévalence, le diagnostic et la distribution des ribotypes [55,155,156]. La première étude européenne sur *C. difficile* a été réalisée en 2008 au sein de 106 laboratoires de 34 pays [55]. L'incidence des ICD et la distribution des ribotypes variaient considérablement entre les hôpitaux. Les auteurs ont pu différencier 65 ribotypes (RT) parmi 389 isolats de *C. difficile*. Une des conclusions de cette étude était que le RT 027 n'était pas prédominant en 2008 et qu'il ne représentait que 5 % des

isolats. Les ribotypes les plus courants étaient alors les ribotypes 014/020 (16 %), 001, (9 %) et 078 (8 %). Quelques ribotypes semblaient se propager au niveau régional, comme le RT 106, principalement décrit au Royaume-Uni et en Irlande. L'étude EUCLID, réalisée en 2012-2013, a inclus 482 hôpitaux de 19 pays européens [156]. Son objectif était d'évaluer la diversité de la répartition des RT en Europe. La diversité de RT retrouvée était plus élevée que dans l'étude précédente, avec 125 RT identifiés parmi 1196 isolats.

Le RT le plus courant était le RT 027 (19 %), soulignant la propagation rapide de ce ribotype à l'échelle mondiale [155]. La comparaison avec les données de 2008 a indiqué une différence dans la variation de la prévalence du RT 027 au Royaume-Uni et en Irlande (prévalence décroissante) par rapport aux pays situés à l'Est de l'Europe (prévalence croissante). Les RT 001/072 (11 %) et 014/020 (10 %) étaient respectivement les deuxième et troisième RT les plus répandus, conformément à l'étude de 2008, mais la prévalence du RT 078 a chuté de 8 % en 2008 à 3 % en 2012-2013. La distribution des RT était pays dépendante [156] (Figure 4).

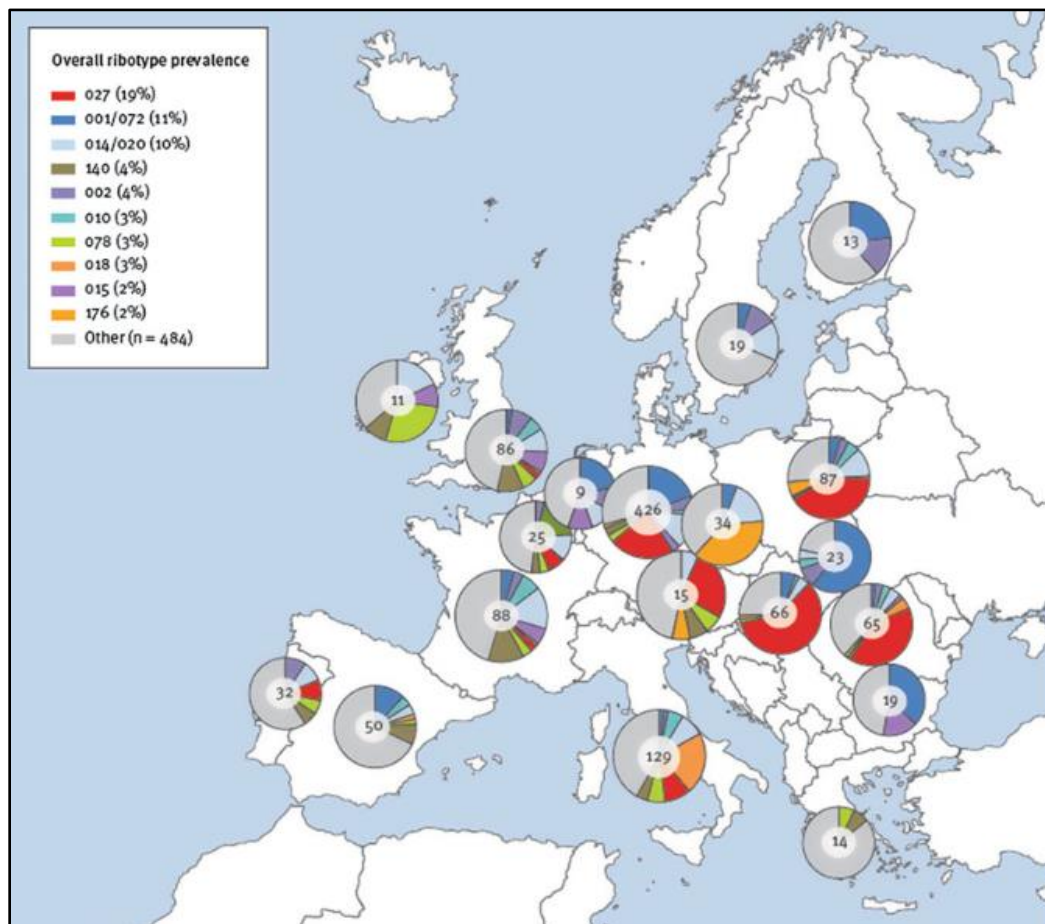


Figure 4. Distribution géographique des ribotypes PCR de *C. difficile*, par pays européen participant, EUCLID 2012-et 2013 (n = 1196). Les disques montrent la proportion des ribotypes les plus courants par pays. Le nombre situé au centre des disques représente le nombre d'isolats typés dans le pays [156].

Une étude en Espagne en 2010 sur 807 échantillons de selles a rapporté que les RT 014/020, 001 et 078/126 étaient les plus répandus (respectivement 20,5 %, 18,2 % et 18,2 %) et n'a pas permis de détecter le RT 027 [157]. Au Portugal, le RT 027 était cependant prédominant avec 18,5 % sur la totalité des souches détectées. Le RT 014 était le deuxième plus fréquent (9,4 %) et la prévalence des RT 126 et 078 était faible (3,8 % et 2,8 % respectivement). Les auteurs décrivaient une grande hétérogénéité de la distribution des RT à travers le pays avec une plus grande diversité dans le nord et une moindre prédominance du RT 027 [158].

En France, une étude multicentrique menée en 2009 dans 78 établissements de santé a montré que le RT le plus fréquent était le 014/020/077 (18,7 %), suivi du 078/126 (12,1%) [64]. La prévalence des souches RT 027 était faible (3,1 %), et celles-ci n'étaient isolées qu'au Nord de la France, où l'émergence du RT 027 a été décrite pour la première fois en 2006 [159,160]. En conclusion, les RT 014/020 et 001/072 sont présents dans presque tous les pays européens alors qu'il existe une spécificité nationale ou régionale pour d'autres RT. La diversité des RT est toujours en augmentation significative dans toute l'Europe.

1.4.10 Particularités des souches épidémiques PCR-ribotype-027

Depuis le début des années 2000, en Amérique du Nord puis en Europe, l'augmentation des cas d'ICD associés à un fort taux de morbidité et de mortalité a été attribuée à une souche particulière, épidémique et qualifiée d'hypervirulente [PCR ribotype 027, PFGE type NAP1 (*North American pulsed field gel electrophoresis type 1*), toxinotype III]. La première souche 027 (CD196), non épidémique, a été isolée en 1985 [161,162]. En 2002, une épidémie provoquée par une souche 027 a eu lieu au Canada, provoquant un nombre important de décès à Montréal. Cette souche a ensuite été isolée en 2005 chez des patients répartis dans plusieurs pays à travers le monde, y compris aux États-Unis et en Australie [163,164]. L'apparition de ce clone hypervirulent a été à l'origine de plusieurs vagues épidémiques sévères et ce clone est devenu une bactérie redoutée en milieu hospitalier [165].

L'« hypervirulence » de la souche 027/NAP1/BI est attribuée, d'une part à la surproduction de toxines TcdA et TcdB, et plus particulièrement par la production de la toxine binaire, et, d'autre part, à une augmentation de la production de spores et une résistance aux antibiotiques, notamment aux fluoroquinolones [165,166]. La résistance aux fluoroquinolones est liée à la présence de 7 mutations ponctuelles au niveau du gène de l'ADN gyrase. La souche 027/NAP1/BI possède deux transposons conjugatifs uniques, dont l'un (CTn-027) codant un

gène de résistance au chloramphénicol. Une analyse génomique comparative entre la souche épidémique 027 R20291 et la souche 630 de PCR-ribotype 012 (souche clinique de référence, dite non hypervirulente), montre que la souche RT 027 possède 234 gènes supplémentaires, ainsi que 47 gènes uniques, et absents chez les autres souches connues. Parmi ces gènes supplémentaires, on retrouve les gènes des toxines, des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes flagellaires et des gènes régulateurs spécifiques [165].

1.5 Manifestations cliniques

L'ICD peut être asymptomatique ou peut se manifester par une légère diarrhée spontanément résolutive ou une diarrhée sanglante sévère [133].

1.5.1 Formes asymptomatiques

Il est important de différencier la colonisation et le portage. Ce dernier est défini comme un hébergement de la bactérie dans le microbiote intestinal, sans symptômes d'ICD, alors que la colonisation fait partie du processus pathologique de l'ICD [167]. Le portage asymptomatique est retrouvé dans la population en établissements de santé et en communauté, et il peut se faire par des souches toxigènes ou non toxigènes [168,169]. Environ 3 % des adultes sont porteurs asymptomatiques de *C. difficile* [168]. Ce pourcentage augmente en fonction de la durée de séjour hospitalier et de l'exposition aux antibiotiques, et peut atteindre 20 à 25 % chez les adultes hospitalisés [170,171].

Il a été également rapporté que le taux de portage asymptomatique chez les enfants jusqu'à l'âge de deux ans peut atteindre 70 à 80 %, dont 63 % sont porteurs de souches toxigènes au sein de la population de nouveau-nés [172,173].

1.5.2 Diarrhée associée aux antibiotiques (DAA)

L'ICD survient généralement après une antibiothérapie, mais peut également survenir chez des patients sans aucun antécédent d'antibiothérapie [174,175]. La DAA fait référence à un épisode diarrhéique qui apparaît comme une complication de l'utilisation des antibiotiques. Elle peut être directe, due à un effet secondaire d'un antibiotique, en particulier avec les antibiotiques à large spectre tels que les pénicillines, les céphalosporines, les fluoroquinolones et la clindamycine, ou indirecte, comme c'est le cas de l'ICD [38]. Elle survient en effet lorsque les antibiotiques perturbent le microbiote intestinal, permettant ainsi aux spores de *C. difficile* de germer et de provoquer l'infection.

Les symptômes des DAA associées aux ICD comprennent des diarrhées aqueuses légères à modérées (< 6 selles / jour), apparaissant typiquement 48 à 72 heures après l'infection. Les diarrhées sont fréquemment accompagnées de douleurs abdominales, de fièvre, de nausées, de léthargie et de déshydratation. Les symptômes peuvent également survenir plusieurs semaines après l'arrêt des antibiotiques et de l'infection à *C. difficile* elle-même [171,176].

1.5.3 Colites pseudomembraneuses (CPM)

Une colite grave due à une ICD peut se compliquer d'une déshydratation, d'un mégacôlon toxique, d'une perforation de l'intestin, d'une hypotension, d'une insuffisance rénale, d'un sepsis et même d'un décès. L'endoscopie confirme le diagnostic de CPM, révélant une muqueuse colique recouverte de plaques surélevées jaunâtres (pseudomembranes) éparses ou confluentes selon le stade de la maladie (Figure 5). L'analyse histologique des biopsies de ces pseudomembranes met en évidence une nécrose superficielle de la muqueuse, un exsudat fibrino-leucocytaire et une accumulation de débris tissulaires et de mucus [177]. Les pseudomembranes, observées chez 30 à 85 % des patients, sont souvent considérées, malgré le manque de preuves, comme un facteur de risque d'ICD sévère. Dans une étude récente, une association a été démontrée entre l'hyperleucocytose (> 20 000 leucocytes/mL) et la formation de ces fausses membranes, ce qui suggère que les patients atteints de CPM pourraient être capables de développer une réponse immunitaire rapide [177]. En effet, des patients recevant des immunosuppresseurs sont moins exposés à la formation de pseudomembranes [177,178].

D'autres données suggèrent que leur présence de CPM a peu d'impact sur le pronostic d'ICD [179]. Ces données remettent aussi en question l'utilité d'une endoscopie basse comme outil de diagnostic chez des patients ayant une ICD confirmée par d'autres moyens. Le recours à cet acte invasif ainsi qu'aux dépenses qui lui sont associées peut ainsi être réduit [177].

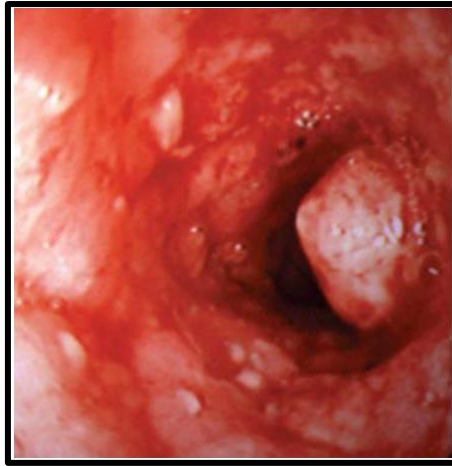


Figure 5. Pseudomembranes à l'examen endoscopique du côlon [180].

1.5.4 Mégacôlon toxique

Les formes sévères de mégacôlon toxique, pour lequel le diamètre du côlon transverse dépasse 6 cm, peuvent aboutir à une perforation colique avec un choc septique nécessitant le recours à la chirurgie [181]. La colite fulminante est une forme très sévère qui se développe chez environ 4 à 10 % des cas d'ICD [182]. Cette forme, peu fréquente, représente une entité clinique distincte avec une réponse inflammatoire systémique et un dysfonctionnement multiviscéral. Elle est caractérisée par une hypotension, une augmentation du taux d'acide lactique, un état de choc, un iléus complet ou un mégacôlon toxique. Le taux de décès dans ce cas est de 50 % [183,184].

Différents facteurs ont été décrits comme étant associés à une ICD sévère, mais l'absence de définition standardisée et les limites méthodologiques rendent la prédiction de la sévérité des ICD difficile et peu fiable [185].

1.5.5 Indices de gravité de l'ICD

La numération des leucocytes et le taux de créatinine ont été adaptés par la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) et la *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) comme critères pour évaluer le niveau de gravité d'ICD. L'ICD légère ou modérée est définie par un taux de leucocytes inférieur à 15 000 /ml et un taux de créatinine sérique inférieur à 1,5 fois le taux normal. Une ICD est dite sévère si le taux de leucocytes est supérieur à 15 000 / ml ou si le taux de créatinine sérique est supérieur ou égal à 1,5 fois le taux retrouvé avant l'infection [77,186]. Une ICD sévère et compliquée fait référence à des cas avec hypotension,

choc, iléus ou mégacôlon. Ces critères permettent d'orienter vers le meilleur choix thérapeutique, cependant, d'autres critères comme l'âge, la température corporelle, les comorbidités, l'albumine sérique, le taux de lactate sérique et d'autres facteurs pourraient jouer un rôle déterminant dans l'évolution des ICD [77,187].

1.5.6 Récidives

L'ICD est particulièrement difficile à traiter en raison de son taux élevé de rechute. Les récurrences peuvent survenir en général 3 jours à 8 semaines après l'arrêt du traitement antibiotique du premier épisode de diarrhée à *C. difficile*. Les rechutes peuvent être multiples, ainsi le risque d'une seconde récurrence serait de 65 % [188].

Dans une étude au Québec, la proportion de patients ayant présenté au moins une rechute était de 28,8 % chez les patients traités par métronidazole et 27,7 % chez ceux traités par vancomycine [189]. Une étude plus récente en 2015 a relevé un taux de première rechute de 13,5 % dans la communauté et de 20,9 % chez des patients en soins de santé [190]. Les facteurs de risque de récurrence comprenaient un âge de 65 ans ou plus, la présence d'une maladie sous-jacente grave ou fulminante déterminée par l'indice de Horn, l'utilisation supplémentaire d'antibiotiques après l'arrêt du traitement par le métronidazole ou la vancomycine pour l'épisode initial d'ICD et une faible concentration sérique d'immunoglobulines G (IgG) anti-toxine A [189,190].

1.6 Diagnostic des ICD

Un diagnostic précoce d'ICD est essentiel à la mise en place du traitement ainsi qu'à la surveillance épidémiologique afin de prévenir la transmission nosocomiale. L'ICD est causée uniquement par des souches de *C. difficile* productrices des toxines. Ainsi, le diagnostic est fondé sur la détection de la bactérie ou de ses toxines. A noter qu'il est déconseillé d'effectuer des études chez des patients asymptomatiques ou en post-traitement [191,192].

Les techniques de référence pour le diagnostic microbiologique des ICDs sont a) la culture toxigénique, une technique qui permet la détection des toxines *in vitro*, et b) le test de cytotoxicité, qui permet la détection des toxines *in vivo* [80]. Il s'agit de techniques lentes, laborieuses, coûteuses et qui nécessitent un personnel formé. C'est pourquoi elles ont été remplacées par des tests plus rapides, qui détectent l'enzyme glutamate deshydrogénase (GDH) bactérienne et les toxines (TcdA, TcdB ou les 2 toxines). Le diagnostic optimal repose sur

l'application d'un algorithme à plusieurs étapes : détection de la GDH simultanée ou non avec les toxines et confirmation ultérieure par des techniques moléculaires. Une autre alternative utilisée pour le diagnostic consiste à détecter des marqueurs biologiques, tels que la lactoferrine ou la calprotectine, afin d'élargir le dépistage. Cependant, dans les dernières directives de la IDSA et de la SHEA, la lactoferrine et la calprotectine ne sont pas validées comme des marqueurs fiables pour le diagnostic des ICDs [77,193].

1.6.1 Test de cytotoxicité

Le test de cytotoxicité (TC) consiste en une inoculation de l'échantillon de selles filtré sur une monocouche cellulaire des lignées Vero, HeLa ou Hep-2. Après 48 à 72 heures, les cultures sont observées pour évaluer le changement de la morphologie cellulaire qui pourrait avoir lieu sous l'effet de la toxine TcdB). En effet, TcdB induirait un arrondissement des cellules [194]. C'est une technique sensible, mais non spécifique, puisque l'effet cytopathique pourrait être lié à d'autres facteurs. Cependant, la confirmation de la spécificité est obtenue en répétant le test avec l'ajout d'un antisérum spécifique dirigé contre *C. difficile*. Cette technique est sensible et spécifique, et peut permettre de détecter d'autres toxines clostridiales. Cependant, un effet cytopathique non spécifique (non neutralisé par l'antisérum) peut être observé dans environ 2 % des cas, rendant toute interprétation impossible. De plus, cette technique souffre d'un manque de standardisation des conditions de collecte et de stockage des échantillons, ce qui risque de générer des résultats faux positifs. La complexité de l'utilisation des lignées cellulaires et le délai (48-72 h) ne permet pas de considérer cette technique comme un test de choix dans le diagnostic des ICDs [195].

1.6.2 Culture toxigénique

La culture toxigénique consiste à réaliser l'isolement de *C. difficile* à partir des fèces des patients suspectés d'être infectés. Il existe actuellement des moyens de culture sélective qui, après une incubation d'au moins 48 h en conditions anaérobies, permettent d'isoler la bactérie [196]. La société française bioMérieux commercialise un milieu chromogénique (CLO) conçu pour isoler et identifier *C. difficile* après 24 h d'incubation avec des rendements optimaux par rapport aux milieux classiques comme la gélose fructose-cyclosérine-céfoxitine (gélose CCFA) décrite par George *et al.*, en 1979 [197]. La sensibilité obtenue avec les milieux CLO et CCFA est estimée respectivement à 74,1 et 87 % à 24 h et à 85,2 et 70,4 % à 48 h d'incubation [198]. Une fois le micro-organisme isolé, il doit être identifié par les techniques microbiologiques

disponibles (coloration de Gram, morphologie des colonies, odeur, fluorescence sous UV...). Après l'identification de *C. difficile*, il est nécessaire de détecter sa capacité à produire les toxines TcdA et TcdB par des techniques immunologiques ou moléculaires, qui seront décrites plus bas, ou encore par un test de recherche des gènes codant les toxines via des méthodes d'amplification des acides nucléiques (NAAT *nucleic acid amplification test*) [167].

Le test de cytotoxicité et la culture toxigénique sont les techniques idéales pour développer de nouvelles méthodes de détection et réaliser des études épidémiologiques.

1.6.3 Détection des toxines TcdA/TcdB par des techniques immunologiques

C'est le test le plus utilisé dans les laboratoires du fait de sa sensibilité et sa spécificité élevées. Les dosages immuno-enzymatique (EIA) et immunochromatographique (TIC) sont disponibles sous forme de plaques à puits ou de membranes facilitant la manipulation des échantillons et l'obtention du résultat (entre 30 min à quelques heures). La plupart de ces techniques détectent la toxine TcdB. La toxine TcdA ne peut pas être détectée toute seule, il est donc recommandé de détecter la toxine TcdB, seule ou combinée (toxine A + B). Les TIC ou les EIA à membrane ou à puits en phase solide ont une sensibilité de 47 à 98,7 % et une spécificité de 84 à 100 %, tandis que les valeurs prédictives positives (PPV) et les valeurs prédictives négatives (VPN) vont respectivement de 50,9 à 100 % et de 87 à 99,8 % [199]. Avec ces valeurs, la possibilité d'avoir un grand nombre des résultats faux négatifs est importante. Pour améliorer la sensibilité des techniques immunologiques, des tests capables de détecter simultanément les toxines A/B associées à la GDH (glutamate déshydrogénase) ont été développés, ce qui a permis d'augmenter la sensibilité jusqu'à 90 % [200]. Ces tests ont été intégrés dans le cadre d'un algorithme de diagnostic des ICDs.

1.6.4 Détection de la glutamate déshydrogénase par des techniques immunologiques

La GDH est une enzyme de la paroi cellulaire de *C. difficile* qui est détectée par des techniques immunologiques de haute sensibilité. Ce test est rapide (30 – 40 min), facile, et sensible (sensibilité de 90 %). Cependant, ce test ne permet pas la différenciation des souches toxigènes et non-toxigènes puisque cette enzyme est produite par les 2 types de souches

[201]. Cet inconvénient a été résolu par la conception des tests cités précédemment et qui détectent à la fois l'enzyme GDH et les toxines TcdA et TcdB [200].

1.6.5 Techniques d'amplification des acides nucléiques

Les techniques d'amplification des acides nucléiques ou NAAT (pour *Nucleic Acid Amplification Tests*) ciblent les régions conservées du gène codant la toxine TcdB. D'autres tests ciblent une partie conservée du gène qui code la toxine TcdA, ou encore des gènes *cdtA* et *cdtB* de la toxine binaire CDT. D'autres encore ciblent la délétion du nucléotide 117 au niveau du gène régulateur *tcdC*, spécifique des souches 027/NAP1, permettant ainsi leur détection spécifique. Ces tests incluent la PCR (*polymerase chain reaction*), l'amplification hélicase-dépendante et l'amplification isothermique à médiation par boucle (LAMP pour *Loop-mediated isothermal Amplification*) [201,202]. Les NAATs sont des techniques rapides (45 min à 3 h), sensibles et plus spécifiques que les GDH EIAs. Ces techniques sont incluses dans la dernière étape des algorithmes utilisés pour le diagnostic des ICDs puisque, bien qu'elles présentent une sensibilité et une spécificité élevées, leur coût est élevé et elles sont souvent utilisées comme des techniques confirmatives [201].

1.6.6 Choix de la stratégie diagnostique

L'ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), la IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) et la SHEA (*Society for Healthcare Epidemiology of America*) recommandent des algorithmes de diagnostic des ICDs pour augmenter au maximum la précision dans la détection des ICDs [77]. Selon ces algorithmes (Figure 6), plusieurs tests doivent être effectués d'une manière séquentielle. Un algorithme alternatif et rapide (algorithme en 2 étapes) consiste à détecter simultanément la GDH et les toxines TcdA et TcdB par EIA, la sensibilité de ces tests permettant d'affirmer l'absence d'une ICD en cas de résultat négatif. Un résultat positif nécessiterait un deuxième test à haute spécificité pour détecter les toxines TcdA et TcdB, permettant d'affirmer la présence de l'ICD, si le test est positif. Si celui-ci négatif, il faudrait envisager une évaluation clinique. Un « algorithme en 3 étapes » consiste à commencer le diagnostic par les tests spécifiques GDH et toxines (EIA). Dans le cas où les 2 tests sont positifs, la présence de l'ICD est confirmée. En revanche, les patients GDH-positifs et toxine-négatifs nécessiteraient un test de confirmation tel que la PCR ou d'autres techniques de haute spécificité. Ces algorithmes ont leur propre inconvénient qui est le temps d'exécution accru [77,80].

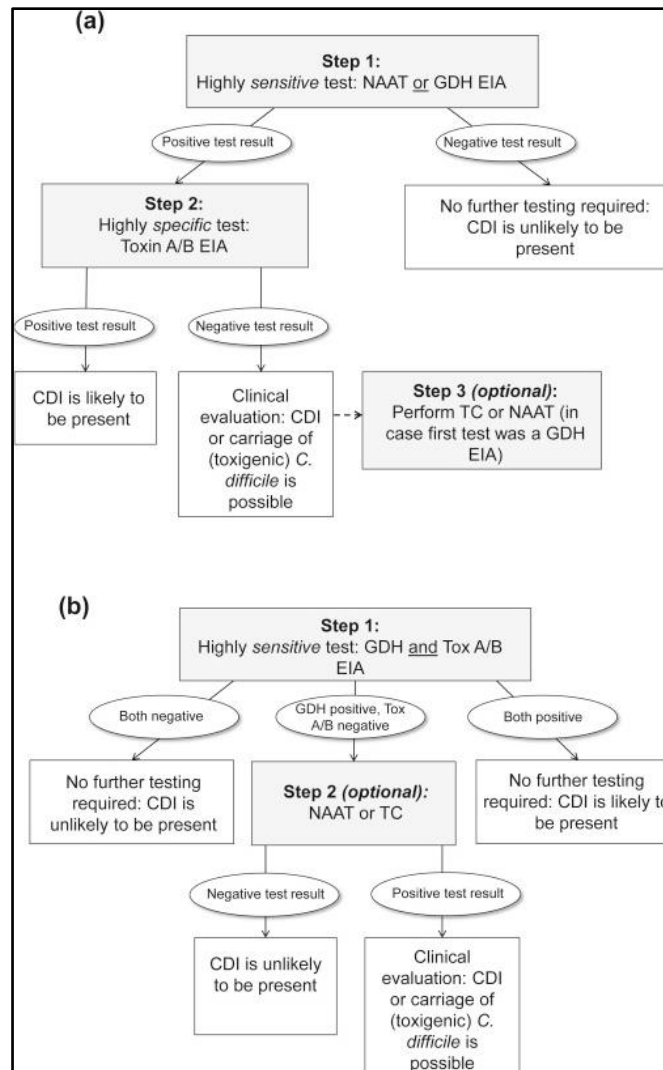


Figure 6. Algorithmes de diagnostic des ICDs selon les recommandations de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). a. Algorithme GDH ou NAAT-Tox A / B, b. Algorithme GDH et Tox A / B - NAAT / TC. Dans les deux modèles proposés, le premier test à effectuer est un test hautement sensible permettant l'affirmation de l'absence d'une ICD alors que le deuxième test doit être hautement spécifique pour éviter les résultats faux-positifs. GDH = glutamate déshydrogénase, NAAT = Test d'amplification d'acides nucléiques, TC = culture toxigène, Tox A / B, toxine TcdA / TcdB ; EIA = test immunoenzymatique [80].

2 Pathogénicité de *C. difficile*

2.1 Généralités sur la physiopathologie des infections à *C. difficile*

C. difficile est une bactérie très répandue dans l'environnement et ses spores sont très résistantes aux températures, aux désinfectants ainsi qu'aux produits chimiques [203,204]. En effet, ces spores sont retrouvées dans les eaux usées traitées, le compost et dans des sols divers ainsi que dans les établissements de santé (toilettes, baignoires, instruments médicaux). Les hôpitaux et les établissements de soins de longue durée constituent ainsi des sources importantes d'exposition à *C. difficile* et peuvent favoriser à la fois la colonisation de l'hôte par

la bactérie et l'infection symptomatique due à une transmission par voie fécale-orale (Figure 7). Une fois dans l'intestin, les spores de *C. difficile* peuvent germer et produire de nouvelles cellules végétatives. Cette germination nécessite l'interaction des acides biliaires primaires, dont le taurocholate, avec le récepteur CspC7, déclenchant ainsi une cascade protéolytique conduisant à la dégradation du peptidoglycane sporal, suivie par la libération du calcium et la réhydratation de la spore aboutissant enfin à la croissance des formes végétatives [205]. Le désoxycholate, un acide biliaire secondaire, agit comme un inhibiteur compétitif du taurocholate et donc comme un suppresseur de la croissance végétative [206].

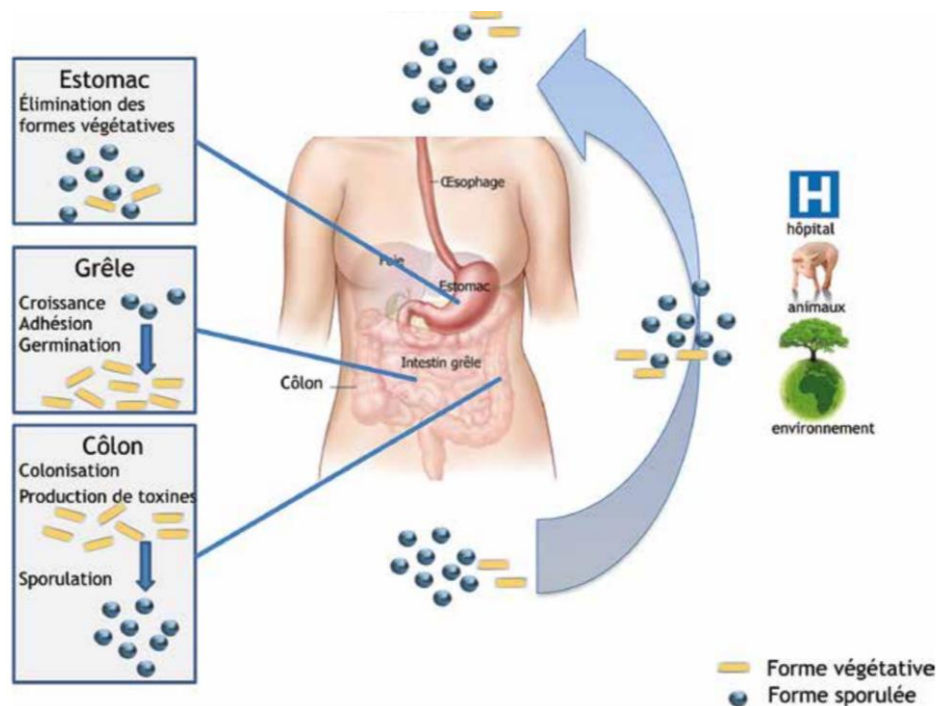


Figure 7. Cycle de vie de *C. difficile* dans l'environnement et le tractus gastro-intestinal humain. Trois sources d'infection (environnement lié aux soins de santé, animaux et environnement) sont indiquées. Une série de facteurs de l'hôte influencent le cycle de vie de *C. difficile*, ainsi que le nombre relatif de spores et de cellules végétatives (métaboliquement actives) dans l'intestin. Le passage dans l'estomac élimine la plupart des cellules végétatives. Cependant, les spores survivent, germent et se développent dans le duodénum. Dans le cæcum et le côlon, *C. difficile* commence à produire des spores à nouveau, et les cellules végétatives sont excrétées par le patient pendant l'infection. La toxine est produite dans le côlon. *C. difficile* étant une bactérie anaérobie stricte, la transmission se fait principalement par les spores [51].

La physiopathologie des ICDs est fortement influencée par la perturbation du microbiote intestinal de l'hôte. Le microbiote intestinal regroupe des milliards de cellules microbiennes qui interagissent avec l'hôte pour maintenir l'homéostasie intestinale, prévenir la colonisation de l'intestin par des pathogènes, limiter l'accumulation des toxines et enfin moduler la réponse immunitaire. De plus, le microbiote assure plusieurs fonctions métaboliques, y compris le métabolisme des acides gras (à chaînes courtes), des acides organiques, des vitamines et des sels biliaires, ainsi que celui des lipides et des acides aminés [207]. Une diminution de la proportion des espèces bactériennes protectrices, notamment due à l'exposition aux

antibiotiques, entraîne ainsi une perte de résistance contre la germination puis la colonisation de *C. difficile*.

La pathogénicité de *C. difficile* est également liée à la sécrétion d'enzymes mucolytiques dont la protéase de surface Cwp84, ainsi que d'autres protéines de surface bactérienne qui contribuent activement à l'adhésion au mucus et aux tissus de l'hôte et à la colonisation digestive par *C. difficile*. Par ailleurs, les facteurs d'adhésion, comme les protéines de la couche S (couche cristalline à la surface de la bactérie), l'adhésine Cwp66, la protéine de liaison à la fibronectine FbpA, la protéine de choc thermique GroEL ou encore les flagelles, contribuent à la colonisation de l'intestin par la bactérie. Ces protéines lui permettent de franchir la barrière de mucus, de s'implanter et de coloniser les cellules épithéliales afin de permettre aux toxines d'atteindre leurs cibles cellulaires. Au vu de l'ensemble des facteurs impliqués dans la colonisation de *C. difficile*, ce processus a longuement été considéré comme étant multifactoriel. En effet, l'inhibition ou la délétion de chacune de ces protéines permettrait d'impacter la colonisation et de lutter potentiellement contre la colonisation intestinale par la bactérie et donc contre les ICDs [208–213].

La croissance végétative de *C. difficile* entraîne la production de toxines, notamment des toxines TcdA et TcdB. Ces toxines se lient à leur récepteur à la surface des cellules épithéliales intestinales, perturbent le cytosquelette d'actine des cellules, et entraînent une déformation cellulaire qui se traduit par un arrondissement, provoquant ainsi une destruction des jonctions intercellulaires. Ces phénomènes réduisent la surface des cellules et diminuent l'absorption des liquides. En conséquence, une accumulation de liquide dans la lumière du côlon a lieu, provoquant alors une diarrhée chez l'hôte. L'inflammation sévère du côlon, qui se caractérise par la présence de fausses membranes sur la paroi du colon, provoque une colite pseudomembraneuse (CPMs) [214]. Dans des cas graves, l'inflammation peut entraîner la perte de la contraction des muscles du côlon et une diminution de la motricité colique provoquant un mégacôlon toxique [215]. Par ailleurs, les toxines TcdA et TcdB induisent la libération des cytokines pro-inflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires.

Certaines souches de *C. difficile* expriment également une autre toxine appelée toxine binaire ou CDT (*Clostridioides difficile* toxin), dotée d'une activité d'ADP-ribosylase spécifique de l'actine provoquant la dépolymérisation de celle-ci, l'altération du cytosquelette et la mort cellulaire [216,217].

Parmi les effecteurs de l'hôte, nous citons les récepteurs de l'immunité innée qui comprennent les récepteurs Toll-like (TLR), à la surface cellulaire, et les récepteurs de type

NOD-like (NLR), présents dans le cytosol. En effet, il a été montré que les composants dérivés du peptidoglycane bactérien activent NOD1. De même, la protéine SlpA est reconnue par le récepteur TLR4 et la flagelline interagit avec le récepteur TLR5 [218–220]. En réponse, les cellules intestinales de l’hôte vont agir en produisant des composants antimicrobiens, y compris le lysozyme et des peptides cationiques antibactériens, comme première ligne de défense [221,222].

L’ICD est une infection bactérienne qui est traitée souvent par des antibiotiques, ce qui peut accentuer la perturbation du microbiote intestinal de l’hôte et empêcher la récupération. Ainsi, les spores de *C. difficile* peuvent persister et causer une infection récurrente (rechute), ou une nouvelle souche peut re-coloniser (réinfection). En effet, environ la moitié des patients qui récidivent dans les deux mois ont une rechute alors que l’autre moitié présente une réinfection [223].

La pathogénèse des infections à *C. difficile* est résumée dans la figure 8.

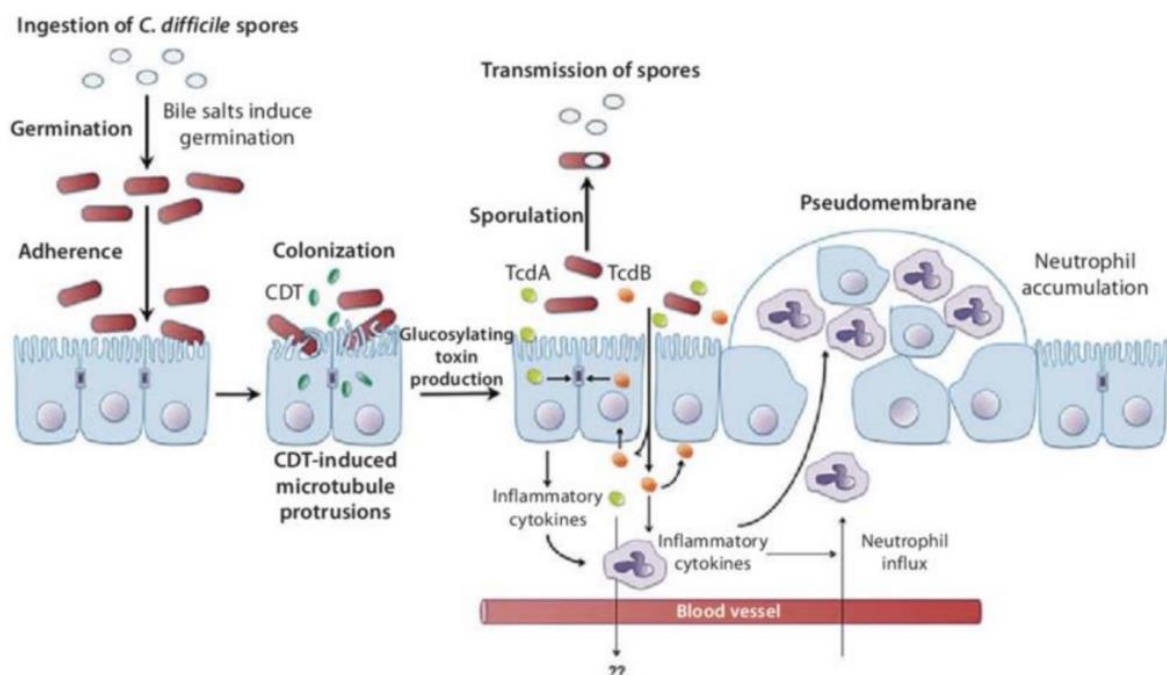


Figure 8. Pathogénèse de *C. difficile*. Les spores de *C. difficile* ingérées, germent sous l’activité des sels biliaires (par exemple le taurocholate) dans l’intestin grêle. *C. difficile* peut coloniser de manière productive le côlon d’individus dont le microbiote intestinal est perturbé. Les souches productrices de toxines stimulent l’inflammation de la muqueuse du côlon en induisant des modifications du cytosquelette qui compromettent la barrière épithéliale. La perturbation des jonctions serrées permet aux toxines de traverser l’épithélium, où elles peuvent en outre induire une activation des voies de signalisation inflammatoires, la production des cytokines et le recrutement des cellules immunitaires. Cela conduit à la formation de pseudomembranes due à l’afflux des neutrophiles et des lymphocytes. Lors de la colonisation de l’hôte, *C. difficile* produit des spores qui sont excrétés par le patient et facilitent la transmission de *C. difficile* aux autres hôtes sensibles. D’après Shen, 2012 [224].

2.2 Les déterminants de pathogénicité de *C. difficile*

2.2.1 Les spores

C. difficile étant incapable de survivre dans les environnements aérobies sous forme végétative, la bactérie produit des spores, qui sont les formes dormantes de la bactérie. Ces formes permettent à la bactérie de persister chez l'hôte et de disséminer facilement dans l'environnement. Les spores sont les particules infectieuses et sont essentielles à la fois à la transmission de la bactérie et à l'initiation de l'infection intestinale. En effet, les souches qui sont incapables de former des spores lors de l'infection intestinale sont également incapables de persister dans le côlon de l'hôte et d'être transmises horizontalement [225]. Elles sont excrétées dans les matières fécales humaines et animales et retrouvées de façon ubiquitaire dans l'environnement, entraînant les contaminations des patients hospitalisés, ainsi que les personnes non hospitalisées dans le cas des infections communautaires, et les animaux [211,226,227]. Les spores de *C. difficile* sont très résistantes et capables de résister à la chaleur, aux irradiations et aux nombreux désinfectants non chlorés utilisés en milieu hospitalier [227,228]. Par ailleurs, étant donné que les spores sont métaboliquement en état latent, celles-ci sont intrinsèquement résistantes aux antibiotiques ainsi, en théorie, qu'aux attaques du système immunitaire de l'hôte [229,230].

Les signaux qui déclenchent la sporulation de *C. difficile* in vivo ou in vitro ne sont pas encore parfaitement identifiés, mais il est suggéré qu'ils pourraient être liés à des stimuli environnementaux tels qu'une carence de nutriments ou d'autres facteurs de stress non identifiés [231]. A noter que la production des spores semble être ralentie chez des souris en l'absence d'antibiotiques [232]. Par ailleurs, le lien entre les ribotypes de la souche de *C. difficile* et l'efficacité de la production ou de la germination des spores reste non confirmé. En effet, plusieurs études ont noté que certains isolats cliniques de *C. difficile*, en particulier ceux du type BI/NAP1/027, sont plus compétents dans la génération de spores que d'autres ribotypes. Cependant, d'autres études ont rapporté une absence de lien entre le ribotype et la génération de spores [232,233].

2.2.1.1 La structure des spores

La capacité des spores à persister dans l'environnement est attribuée à leur structure. Ces endospores sont composées d'une paroi sporale dense, le manteau ou coat, avec des couches concentriques intérieures formant le cortex (Figure 9A). Le noyau est entouré d'une couche

épaisse de peptidoglycane, comprenant des amas de ribosomes et une multitude de complexes nucléoprotéiques. L'extérieur est couvert par une couche externe lâche, appelée exosporium [234,235]. Cette dernière est présente dans les spores des espèces du groupe *Bacillus cereus* ainsi que dans un certain nombre d'espèces clostridiales, dont *C. botulinum*, *C. sordellii* et *C. difficile* [236,237]. L'exosporium de *C. difficile* présente des protéines de type collagène homologues aux protéines exosporiales des espèces de *Bacillus*, ainsi qu'une protéine riche en cystéine, la protéine CdeC [238]. Concernant la structure de l'exosporium, il est composé d'une couche basale paracrystalline sur laquelle est ancrée une couche velue de fibres (Figure 9B) constituées de 336 polypeptides dont 88 sont communs au genre *Clostridium* et 29 sont spécifiques à *C. difficile*. Ces protéines, notamment celles de type collagène BclA, sont impliquées dans les processus de sporulation, de germination, de traduction et de stabilisation et dégradation des protéines sporales [235,237,239,240].

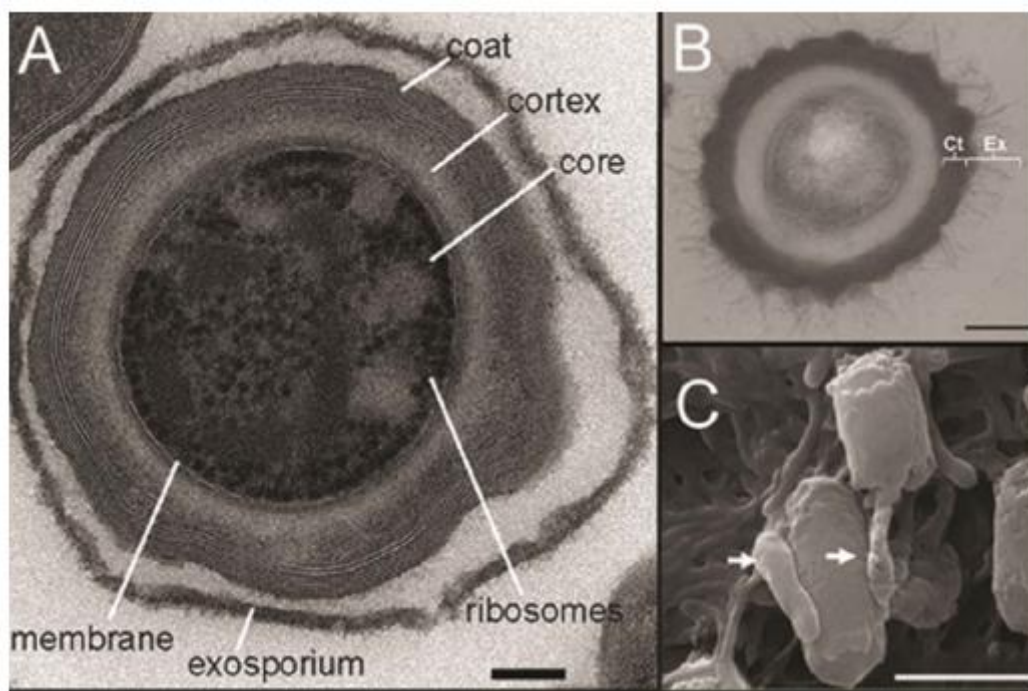


Figure 9. Spores de *C. difficile* observées en microscopie électronique. (A) Image montrant l'ultrastructure des spores de la souche *C. difficile* 630 comprenant l'exosporium, le manteau ou *coat*, le cortex, le noyau, la membrane et les ribosomes. Barre, 100 nm. (B) Image montrant une spore de la souche *C. difficile* R20291, comprenant la couche épaisse des spores (Ct) et l'exosporium (Ex). Barre, 200 nm. (C) Image de microscopie électronique à balayage des spores de *C. difficile* 630 adhérant à des cellules Caco-2. Les flèches indiquent l'interaction des spores avec les microvillosités des cellules Caco-2. Barre, 1000 nm [235,238,241].

Des études protéomiques et bioinformatiques réalisées sur les spores de *C. difficile* ont révélé la présence de nombreuses protéines incluses dans la spore, y compris CotA, CotB, CotCB, CotD, CotE et SodA [235,242,243]. Des essais de mutagenèse ont montré que CotA

est essentielle dans la formation d'un manteau fonctionnel, tandis que CotD et CotG sont des protéines à activité catalase. SodA, codé par le gène *sodA*, fait partie de la famille des dismutases et CotE joue à la fois le rôle de peroxiredoxine et de chitinase [243]. La protéine CspC, codée par le gène *cspC*, a été identifiée comme un composant essentiel du système qui détecte les acides biliaires et déclenche la germination [19,244]. En outre, l'analyse structurale des protéines de surface des spores de la souche 630 a permis d'identifier 54 protéines, dont la plupart présentent une similitude avec des protéines à fonctions enzymatiques, y compris des hydrolases de la paroi cellulaire, des oxydoréductases et des catalases [245]. Chez de nombreuses espèces de *Clostridium*, l'entrée en phase de sporulation est régie par plusieurs histidines kinases orphelines capables de phosphoryler le régulateur transcriptionnel Spo0A, considéré comme étant le maître régulateur de la sporulation. Parmi les histidines kinases, nous pouvons citer CD1352, CD1492, CD1579, CD1949, et CD2492, qui sont exprimées chez la souche 630 de *C. difficile*. L'inactivation de CD2492 réduit de 3,5 fois la formation de spores par rapport au phénotype sauvage, alors que la mutation de Spo0A abolit complètement la formation de spores [233,246]. Le mécanisme par lequel Spo0A est phosphorylé lors de l'initiation de la sporulation de *C. difficile* n'est pas encore bien compris. À ce jour, la seule kinase histidine orpheline de *C. difficile* pouvant être responsable de l'autophosphorylation et du transfert d'un phosphate directement à Spo0A est CD1579. Cependant, en plus de la sporulation, la mutation de Spo0A peut affecter d'autres processus cellulaires durant l'infection. En effet, cette mutation affecte notamment la récurrence de l'infection et la transmission de la bactérie [225,246,247].

2.2.1.2 La germination des spores

Pour coloniser et provoquer l'infection, les spores de *C. difficile* doivent germer chez l'hôte. La germination est facilitée par la présence de sels biliaires contenus dans le tractus digestif [22,248,249]. Les sels biliaires contenant du cholate, en particulier le taurocholate de sodium, favorisent la germination. En revanche, les acides chénodésoxycholiques, qui sont réabsorbés par l'intestin plus rapidement que les acides choliques, agissent comme des inhibiteurs compétitifs, sont capables ainsi d'inhiber la germination des spores et le développement des formes végétatives de *C. difficile*. Suite à des perturbations du microbiote intestinal, l'abondance relative de ces sels biliaires peut changer, favorisant la germination des spores de *C. difficile*, la croissance végétative de *C. difficile*, l'établissement d'une infection et la production et la libération de nouvelles spores [206,250].

2.2.2 Les protéines de surface

La colonisation est une étape cruciale pour *C. difficile*. Elle assure à la bactérie la persistance dans le tube digestif, principalement au niveau colique, et l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales. La première interaction entre la bactérie et l'hôte fait intervenir des composants de la surface bactérienne. Plusieurs protéines de surface, impliquées dans l'association au mucus et à la cellule intestinale, ont été identifiées chez *C. difficile*, dont certaines se sont révélées être impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi ces protéines, nous décrivons ci-dessous les plus connues.

2.2.2.1 Généralités sur l'adhésion de *C. difficile*

L'adhésion aux cellules hôtes est la première étape de la colonisation et de l'établissement de l'infection pour de nombreux agents pathogènes. En effet, l'adhésion des spores et des cellules végétatives de *C. difficile* a été mise en évidence suite à leur interaction avec les cellules épithéliales intestinales de l'intestin grêle et du côlon chez l'homme, ainsi qu'in vitro en présence de différentes lignées cellulaires épithéliales telles que les cellules Vero (cellules de rein de singe), HeLa (cellules humaines dérivées d'un cancer du col de l'utérus), Hep-2 (cellules tumorales de carcinome laryngé humain), Caco-2 (cellules issues d'un cancer colorectal humain), HT-29 (cellules issues d'un cancer colorectal humain) et HT29-MTX (cellules tumorales coliques sécrétrices de mucus) [251–253]. Par ailleurs, il a été montré que l'adhésion de *C. difficile* aux cellules Caco-2 est plus importante au pôle basolatéral qu'au pôle apical des cellules [254]. De plus, il semble que les spores d'une souche de ribotype 027 adhèrent mieux aux monocouches des cellules épithéliales humaines que les spores d'un isolat de ribotype 002 [241,255]. L'adhésion de *C. difficile* aux cellules de l'hôte fait intervenir des adhésines bactériennes qui sont essentiellement des protéines de surface, comme les protéines de la couche de surface (protéines de couche S ou S layer protein, SLP) et les protéines de la paroi cellulaire (cell wall proteins, CWP), que nous détaillerons dans le paragraphe suivant.

2.2.2.2 Les protéines de la couche de surface (SLP) et de la paroi cellulaire (CWP)

Parmi les protéines de la paroi de *C. difficile*, appelées les protéines de la paroi cellulaire (CWP), les protéines de la couche de surface (ou couche S, SLP) sont les mieux caractérisées. Des études génétiques ont montré la présence de 29 paralogues de *slpA* (gène codant le précurseur des protéines de la couche S) dans le génome de la souche 630 de *C. difficile* [256]. Ces protéines contiennent un motif complexe de liaison à la paroi cellulaire caractéristique des

SLP. Ce motif, considéré comme un motif potentiel d'ancrage à la paroi bactérienne (« Cell Wall Binding 2 »), est localisé, soit au niveau de la partie N-terminale, soit dans la partie C-terminale. En plus de ce domaine commun, les CWP possèdent un domaine spécifique variable dont la fonction biologique est connue ou supposée [242,257]. Parmi ces protéines, 12 CWP sont codées par des gènes localisés au sein d'un cluster de 37 kb, appelé locus *cwp* (Figure 10). Nous citons les gènes codant les adhésines Cwp66, la protéase Cwp84, la protéase Cwp13 et le précurseur SlpA des protéines de la couche S [258–260].

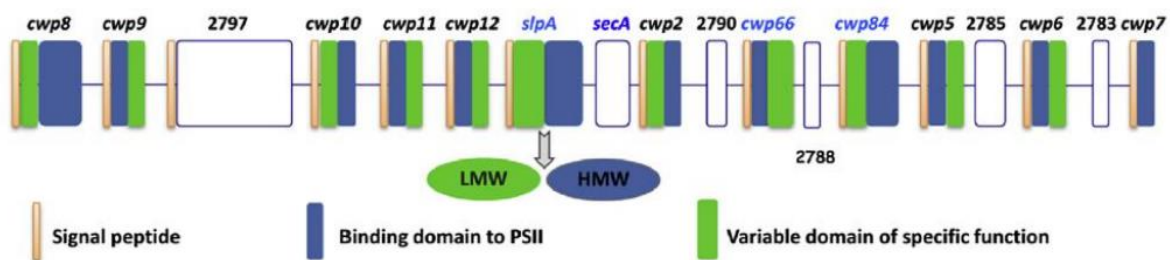


Figure 10. Locus représentant les gènes qui codent les protéines de surface CWP de *C. difficile*. Le cluster de gènes "clostridial wall proteins (*cwp*)" porte 18 cadres ouverts de lecture (ORFs) parmi lesquels 12 codent des protéines avec un peptide signal (en beige), un domaine de liaison conservé à la surface bactérienne (en bleu, situé dans la partie N ou C-terminale de la protéine) et un domaine variable entre les paralogues responsables d'une fonction spécifique (en vert) [261].

i. La cystéine protéase Cwp84

Cwp84 (cell wall protein 84), une cystéine protéase identifiée comme l'une des enzymes protéolytiques de *C. difficile*, a été caractérisée pour la première fois dans notre laboratoire [208,262]. Cette protéine située à la surface bactérienne et associée aux protéines de la couche S [208] se présente sous deux formes : la forme entière de la protéine de 80 kDa et sa forme clivée de 47 kDa [263]. La forme entière possède une structure en trois domaines : un peptide signal, un domaine N-terminal qui présente une activité catalytique et un domaine C-terminal homologue au domaine d'ancrage de l'adhésine Cwp. Cwp84 est impliquée dans le clivage et la dégradation de certaines protéines de la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte, telles que la fibronectine, la vitronectine ou la laminine [208,263].

ii. La cystéine protéase Cwp13

La protéase Cwp13 est un homologue protéique de Cwp84. Ces deux protéines présentent en effet une forte identité de séquence protéique (63,2 %). Cwp13 possède une faible activité dans le clivage des protéines de la couche S. Récemment, il a été montré qu'elle joue un rôle dans le processus de maturation de Cwp84 [262].

iii. *L'adhésine Cwp66*

Cwp66 (66 kDa) est impliquée dans l'adhésion bactérienne. Elle est exprimée chez toutes les souches de *C. difficile*, qu'elles soient toxigènes ou non [262]. Cette protéine présente une structure en trois domaines classique des CWPs : un peptide signal, un domaine N-terminal d'ancrage potentiel à la paroi bactérienne hébergeant trois motifs Pfam 04122, et un domaine C-terminal, exposé à la surface de la bactérie, qui possède des homologies avec différentes protéines bactériennes de surface comme l'autolysine de *Bacillus subtilis* CwlB [209,264,265]. Cwp66 a été détectée grâce à des anticorps dirigés contre des protéines de surface de bactéries soumises à un choc thermique, ce qui suggère qu'elle pourrait jouer le rôle de protéine de choc thermique associée à la surface. En effet, l'adhésion de *C. difficile* in vitro est réduite dans des cellules soumises à un choc thermique, en présence d'anticorps dirigés contre les domaines N-terminal et C-terminal de Cwp66. [209].

iv. *L'adhésine CwpV*

CwpV (167 kDa) est la plus grande protéine de la famille des protéines CWPs. Des analyses en Western Blot et par PCR ont permis d'identifier un rôle de cette protéine dans l'agrégation des bactéries entre elles, dans la formation des biofilms et donc dans la colonisation de l'hôte [266,267]. Cette protéine, codée par le gène CD0514, présente la structure en trois domaines des CWPs avec, d'une part le domaine d'ancrage potentiel N-terminal conservé et comportant trois motifs Pfam 04122, et, d'autre part, le domaine C-terminal variable, ce qui permettrait à la bactérie d'échapper à la réponse immune de l'hôte. Chez la souche 630, la partie C-terminale fonctionnelle contient neuf régions répétées de 120 acides aminés et possède une région riche en sérine/glycine [266,266,267].

v. *Les protéines de la couche S*

Les protéines de la couche S (SLP) sont exprimées chez de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais également chez les archéobactéries. Elles sont associées à la surface sous forme des réseaux paracrystallins, formés par des sous-unités identiques de glycoprotéines. Les SLP agissent comme des tamis moléculaires : elles protègent les facteurs de virulence contre les attaques parasitaires et maintiennent l'intégrité de la paroi cellulaire. De plus, ces protéines jouent un rôle dans la division cellulaire et la formation de biofilms [268]. Chez *C. difficile*, la couche S semble importante pour la croissance, qui est sérieusement affectée chez les mutants possédant un gène *slpA* non fonctionnel [269]. La couche S de *C. difficile* est principalement composée de deux sous-couches. La première est externe, fine et

constituée d'une protéine de faible poids moléculaire (36 kDa), dite Low-Molecular Weight-Surface Layer Protein (LMW-SLP). La deuxième sous-couche est interne, plus épaisse et constituée d'une protéine de haut poids moléculaire (47 kDa), High-Molecular Weight-Surface Layer Protein (HMW-SLP), qui correspond à la partie C-terminale du précurseur, relativement conservée entre les souches [270].

Ces deux protéines dérivent d'un précurseur commun SlpA, après un double clivage post-traductionnel. Le premier clivage en N-terminal libère le peptide signal et le second, à l'intérieur du précurseur et assuré par la protéase Cwp84 (au niveau de la sérine 321), permet la libération des deux protéines matures LMW-SLP et HMW-SLP. La région du site de clivage protéolytique est hautement conservée. Les deux sous-unités LMW-SLP et HMW-SLP sont étroitement liées par une liaison complexe non covalente, au niveau des résidus 260-321 de la partie C-terminale de la LMW-SLP d'une part, et des résidus 1-40 de la partie N-terminale de la HMW-SLP d'autre part (Figure 11) [271,272]. Il a été montré que des bactéries *C. difficile* ayant subi un traitement chimique de suppression des SLP présentaient une adhésion moins importante, à la fois dans des modèles cellulaires et dans des modèles animaux. Ceci a permis de suggérer un rôle important des SLP dans l'adhésion à l'hôte [273].

Par ailleurs, les SLP semblent moduler la réponse immunitaire. En effet, l'incubation de monocytes avec des SLP purifiés de *C. difficile* induit la production d'interleukines IL-1 β , IL-6 et IL-10 en induisant la production d'interleukines IL-1 β , IL-6 et IL-10 [274]. De plus, LMW-SLP est immunologiquement variable, ce qui pourrait conférer à *C. difficile* un moyen d'échapper et de résister au système de défense de l'hôte [271,272,275]. Il a également été démontré que les SLP sont reconnues par le récepteur TLR4 dans les cellules dendritiques et peuvent induire la maturation de ces dernières in vivo [220].

Un modèle de l'assemblage des protéines de la surface de *C. difficile* est présenté dans la figure 11.

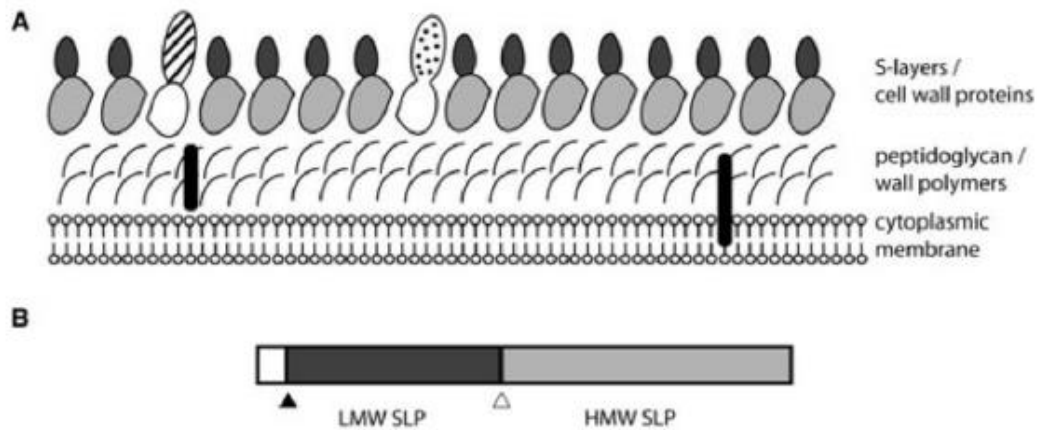


Figure 11. Modèle de paroi cellulaire de *C. difficile*. (A) Deux sous-unités de protéines de couche de surface sont présentés. Les SLP de hauts poids moléculaires (HMW SLP) sont représentées en gris clair et les SLP de faible poids moléculaire (LMW SLP) sont représentées en gris foncé. Les structures blanches représentent d'autres protéines mineures de la paroi cellulaire et les barres noires verticales les polymères de la paroi cellulaire. (B) La protéine précurseur SlpA, avec les sites de clivage produisant le peptide signal (en blanc), sont indiqués par la flèche noire et les HMW SLP (en gris) et LMW SLP (en noir) matures sont séparées par la flèche blanche [272].

2.2.2.3 Les polysaccharides

Trois polysaccharides (PS) de surface cellulaire, PSI, PSII et PSIII, ont été décrits pour les cellules végétatives de *C. difficile* y compris pour celles du ribotype 027, qui exprime PSII de façon très abondante. Le PSI est composé d'unités répétitives de phosphate pentaglycosyl qui comprennent du rhamnose (Rha) et du glucose (Glc) reliés par un pont de phosphate de glycosyle. Le PSIII est un glycane insoluble dans l'eau, de type acide lipoteichoïque, qui n'est pas exprimé régulièrement ou abondamment in vitro [276]. Le PSII est reconnu comme étant un antigène conservé de *C. difficile* et a donc attiré la plupart des efforts de vaccination à base de PS.

2.2.2.4 Les protéines de liaison à la matrice extracellulaire

C. difficile se lie aux protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et la vitronectine [254]. La bactérie possède une protéine de 68 kDa qui lie la fibronectine, nommée FbpA (pour Fibronectin binding protein A), identifiée au sein de notre laboratoire. Cette protéine, codée par le gène fbp68, qui semble être hautement conservé parmi les souches de *C. difficile*, présente des homologues significatives avec d'autres protéines bactériennes de liaison à la fibronectine. Cette protéine associée à la surface est capable de lier la fibronectine soluble et immobilisée et d'adhérer aux cellules Vero pré-incubées avec de la fibronectine. Comme de nombreux facteurs de virulence de *C. difficile*, le rôle de cette protéine dans la pathogénèse n'est pas bien élucidé. Néanmoins, il a été démontré

que des anticorps dirigés contre la protéine FbpA purifiée inhibent partiellement l'adhésion de *C. difficile* à la fibronectine et aux cellules Vero, suggérant ainsi l'implication de cette protéine dans le processus de colonisation intestinale de *C. difficile* [210]. Cette hypothèse est soutenue par des études in vivo qui ont montré que la protéine FbpA est impliquée dans l'adhésion et la colonisation chez la souris dixénique (souris gnotoxénique colonisée par la souche sauvage et la souche mutante pour FbpA). En revanche, une étude in vitro effectuée sur les souches mutantes dépourvues de FbpA a suggéré que, l'absence de FbpA n'aurait aucun impact sur le taux d'adhésion de *C. difficile* à différentes lignées cellulaires épithéliales (Caco-2 et HT29-MTX) [277,278].

La protéine CbpA est une autre protéine bactérienne récemment identifiée comme étant une protéine de liaison au collagène. Elle est en effet capable de se lier aux collagènes I et V, les composants les plus communs du collagène et présents dans de nombreux tissus, y compris l'intestin [279]. Cette protéine de haut poids moléculaire (environ 118 kDa) possède un domaine N-terminal de liaison au collagène. Quant à son domaine C-terminal, il comporte un motif peptidique SPKTG qui permettrait l'ancrage à la surface bactérienne grâce à la sortase B [280]. La protéine recombinante tronquée dans sa partie C-terminale exprimée chez *E. coli* a montré une capacité de se lier in vitro aux collagènes de type I et V et de co-localiser avec des fibres de collagène de fibroblastes humains et de tissus de l'intestin de souris. En revanche, une souche mutante de *C. difficile* dépourvue de CbpA adhère au collagène de manière similaire à la souche parentale [279]. Ces résultats suggèrent que CbpA est sans doute l'une des nombreuses adhésines de *C. difficile*, mais probablement pas la plus importante, au moins dans les conditions testées.

Récemment, une nouvelle métalloprotéase, ZmpI, a été identifiée [281]. Cette protéine présente une similitude de séquence avec le facteur létal de *Bacillus anthracis*, lequel est capable de dégrader les protéines associées à la matrice extracellulaire, en particulier le fibrinogène et la fibronectine [281]. Cette propriété de ZmpI pourrait améliorer le caractère invasif, la propagation et la colonisation de *C. difficile*, comme il l'a été démontré pour d'autres agents pathogènes [282].

2.2.2.5 La protéine de choc thermique GroEL (Hsp60)

Il a été démontré que l'adhésion de *C. difficile* aux cellules épithéliales in vitro augmente à la suite d'un choc thermique. Ce phénomène a conduit à l'identification et à la caractérisation

de Cwp66 décrite précédemment (paragraphe 2.2.2.2.iii), mais a également suggéré un rôle d'adhésion pour d'autres protéines de choc thermique telles que GroEL. Cette dernière est une protéine chaperonne de 58 kDa qui est exprimée suite à l'exposition de la bactérie à un certain nombre de facteurs de stress tels que la chaleur, les chocs acides ou osmotiques, la privation de fer, la présence de concentrations sub-inhibitrices d'ampicilline ou suite à un contact avec des cellules eucaryotes in vitro. Cette protéine est un membre de la famille des protéines de stress Hsp60 (Heat Shock Protein), situées principalement au niveau cytoplasmique, mais également associées à la paroi bactérienne de *C. difficile*. Elle serait libérée dans le milieu extracellulaire après un choc thermique à 48 °C, puis refixée à la surface bactérienne par un mécanisme inconnu [283].

Par ailleurs, des anticorps dirigés contre la protéine GroEL recombinante et la protéine native purifiée inhibent l'adhésion de *C. difficile* aux cellules eucaryotes in vitro, après un choc thermique, suggérant que cette protéine jouerait un rôle dans l'adhésion [211]. Plus récemment, il a été noté que la vaccination par la protéine GroEL recombinante réduit le taux de colonisation intestinale de *C. difficile* chez les souris infectées, suggérant un rôle de GroEL dans la colonisation intestinale de *C. difficile* [284].

2.2.3 Les flagelles

2.2.3.1 Structure et fonction des flagelles de *C. difficile*

Le flagelle bactérien est responsable de la capacité des bactéries à être mobiles, coloniser les cellules, optimiser leur croissance et leur survie et échapper à la dessiccation dans l'environnement de l'hôte [285]. Le flagelle, qui est constitué d'un moteur moléculaire, d'un corps basal, d'un crochet et d'un filament rotatif, est considéré comme un système de sécrétion spécialisé de type III dérivé d'une structure ancestrale [286] (Figure 12). Les protéines motrices fournissent la puissance à la structure « corps basal – crochet » afin d'entraîner la rotation du flagelle. Le corps basal est un complexe protéique membranaire intégral qui permet la translocation d'autres protéines flagellaires structurelles à l'extérieur de la cellule [286,287]. Une fois ces protéines assemblées, la structure en crochet agit comme un joint auquel les protéines du filament peuvent être assemblées de manière hélicoïdale. La puissance fournie par les protéines motrices peut ainsi entraîner la rotation du filament du flagelle, assurant la mobilité de la bactérie [287]. Les flagellines bactériennes sont les composants protéiques structuraux principaux des filaments des flagelles bactériens. Elles sont constituées de 250 à 1080 acides aminés en fonction des espèces [288].

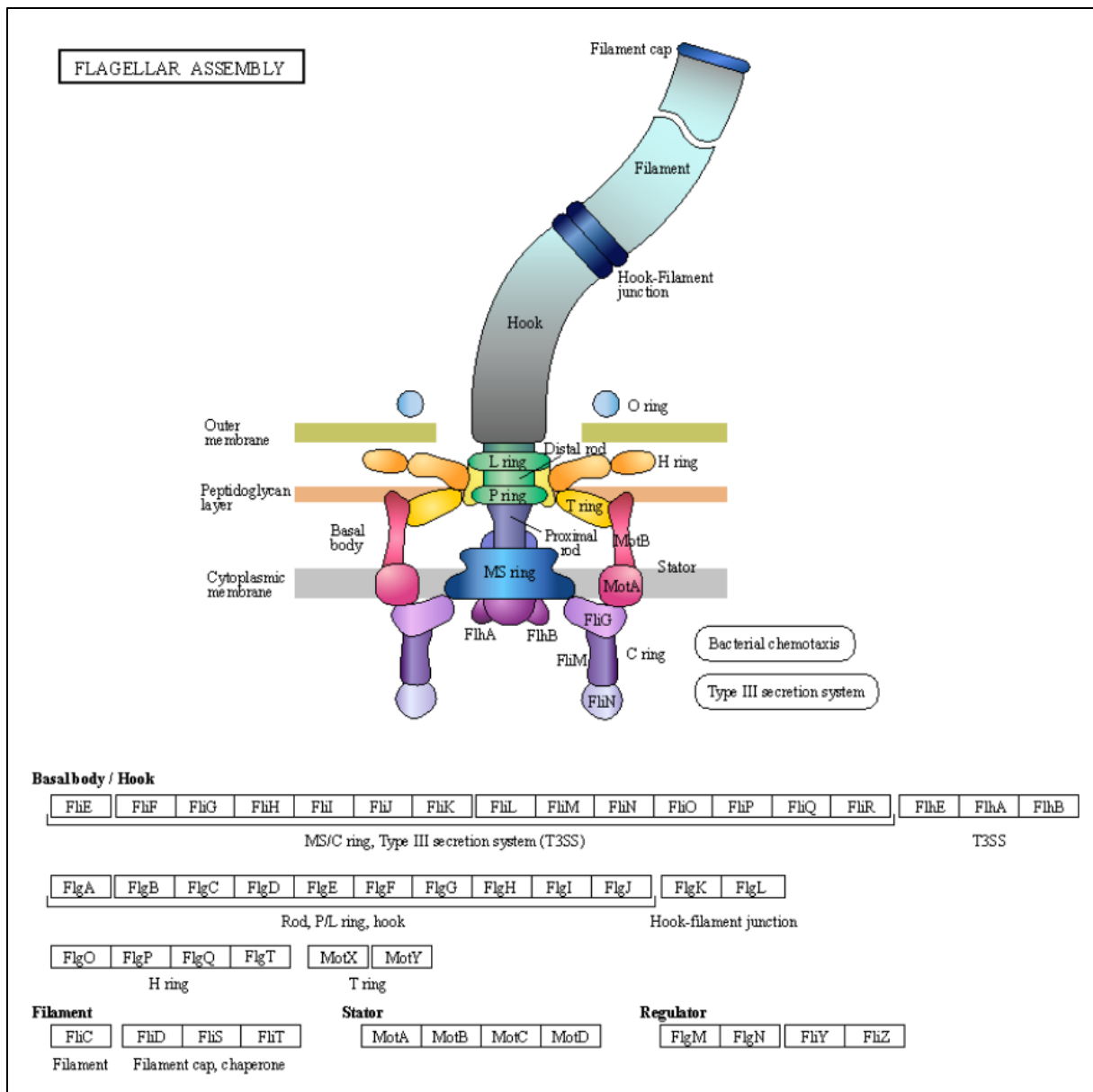


Figure 12. Représentation schématique de la structure du flagelle bactérien. Organisation structurale représentative d'un flagelle dans une bactérie à Gram-négatif. Le complexe corps-basal (basal body) intégral permet la translocation de protéines structurales et les protéines du crochet (hook) hors de la cellule. Le filament est constitué de sous-unités répétées de flagellines FliC et sa coiffe distale FliD. La structure du crochet ancre les protéines filamenteuses au corps basal, permettant la formation d'un flagelle mature. La rotation du flagelle entièrement formé est possible grâce au moteur interne et aux protéines attachées au complexe corps-basal. L'appareil d'export flagellaire est composé des protéines transmembranaires FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR, des chaperons FliJ, FliS and FliT, ATPase FliI et du régulateur FliH. FliI permettrait le couplage de l'hydrolyse de l'ATP et l'export de protéines, et semble être régulée négativement par FliH. L'appareil d'export flagellaire permet la translocation et l'assemblage des composants du corps basal, du crochet et du filament [289,290].

Les flagelles bactériens sont impliqués dans le développement de la pathogénèse bactérienne en : (i) favorisant l'adhérence aux cellules hôtes ; (ii) fournissant une mobilité ; (iii) favorisant la formation de biofilms ; (iv) facilitant la translocation des facteurs de virulence à travers les membranes cellulaires ; et (v) en agissant comme des immunomodulateurs en

déclenchant la production de cytokines chez l'hôte via une interaction avec le récepteur de la réponse innée Toll-like 5 (TLR5) [286,291].

Il est connu que de nombreuses souches pathogènes gastro-intestinales dont *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* et *Helicobacter pylori* sont mobiles grâce à leurs flagelles [292]. Des mutations des gènes flagellaires chez ces bactéries ont diminué leurs capacités à coloniser l'hôte, à établir des infections, et à adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin grêle. De plus, les mutants flagellaires de *C. jejuni* au niveau de gènes codant trois composants structurels des flagelles, les gènes du corps basal flagellaire (flgB et flgC), du crochet (flgE2) et du filament (flaA et flaB), présentent une déficience dans la sécrétion de certaines protéines de virulence. Ainsi, comme *C. difficile* occupe une niche environnementale semblable à celui de ces pathogènes intestinaux, les flagelles de *C. difficile* pourraient également jouer un rôle important dans la colonisation et la pathogénicité [292–295].

Jusqu'à récemment, les flagelles de *C. difficile* étaient considérés comme n'étant impliqués que dans la colonisation de l'hôte. Cependant, la contribution des flagelles à la pathogénèse de *C. difficile* semble bien plus complexe et reste peu claire. Certaines études suggèrent que les flagelles joueraient un rôle direct dans la virulence, via la modulation de l'expression des toxines plutôt que simplement en conférant la mobilité aux bactéries [296–298].

2.2.3.2 Structure des flagellines de *C. difficile*

Chez *C. difficile*, le composant protéique structural principal du filament des flagelles est le monomère de flagelline FliC. Ces monomères de FliC sont assemblés de manière répétée pour constituer le filament flagellaire. Ce dernier est coiffé à son extrémité distale par la protéine monomérique FliD. Sur le plan structural, des études de cristallographie ont permis de caractériser quatre domaines distincts D0, D1, D2 et D3 au sein de FliC (Figure 13). Le domaine D1 est situé dans la région de la tubulure externe du filament (outer-tube : OT), alors que le domaine D0 est situé dans la région de la tubulure interne (inner-tube : IT) [299]. Ces 2 domaines adoptent une structure en hélice alpha (α). Ils forment une région hautement conservée parmi les flagellines bactériennes, constituée de 160 acides aminés à l'extrémité N-terminale (domaine D1) et 90 résidus à l'extrémité C-terminale (domaine D0). La région D0-D1 joue un rôle important dans la polymérisation des filaments de la flagelline [300] et est essentielle dans la signalisation cellulaire, via une interaction de la région N-terminale avec le

récepteur spécifique des flagellines, le Toll-like receptor 5 (TLR5) [291]. Les domaines D2 et D3 varient structurellement d'une espèce bactérienne à une autre [299,301]. La conformation spatiale de cette région centrale de la flagelline est principalement en hélice β . Cette région confère à la flagelline son immunogénicité et est impliquée dans la réponse immunitaire innée. Cependant, le rôle respectif de chacun de ces domaines reste très débattu [302,303].

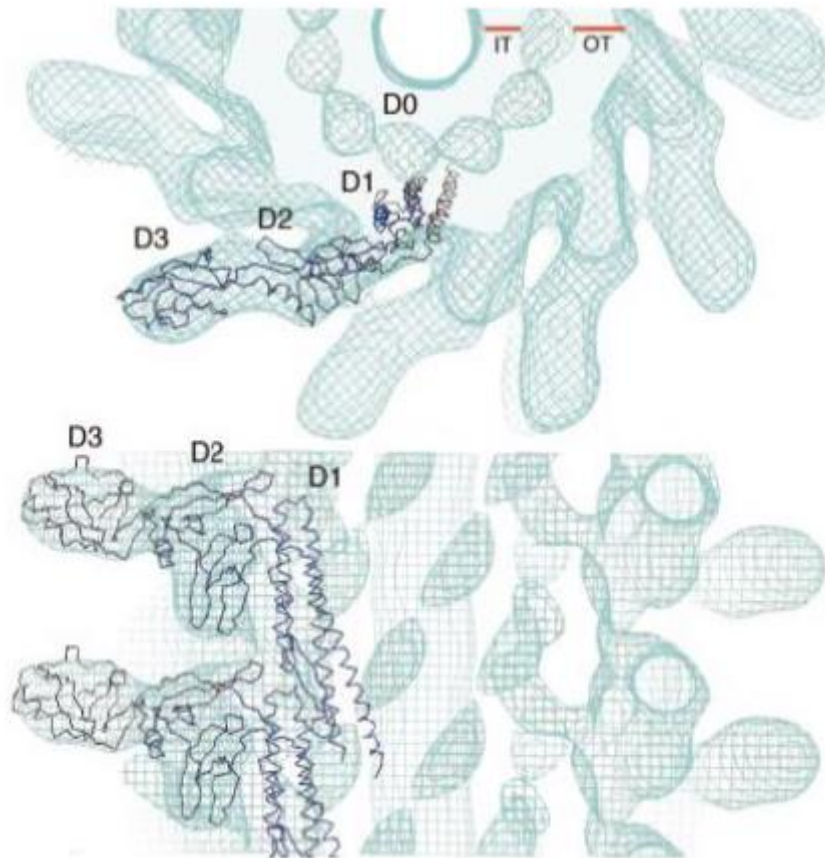


Figure 13. Structure de la flagelline en cristallographie. Aspect de la flagelline en bout de l'extrémité distale et du côté extérieur du filament. D0, D1, D2 et D3 indiquent les domaines de la flagelline. IT : tubulure interne (*inner-tube*) ; OT : tubulure externe (*outer-tube*). La résolution du plan de densité a été limitée à 20Å° [299].

2.2.3.3 Organisation génétique des gènes flagellaires de *C. difficile*

Les gènes qui régissent l'assemblage des flagelles de *C. difficile* sont organisés en trois opérons distincts appelés les régulons F1, F2 et F3. La transcription des gènes flagellaires chez *C. difficile* débute par les gènes de stade précoce situés dans la région F3. Le contrôle transcriptionnel du régulon F3 chez *C. difficile* dépend d'une variation de phase via une inversion d'un fragment de 154 paires de base d'ADN appelé « flagellar switch ». Dans une orientation, un facteur sigma alternatif SigD est transcrit et permet l'expression de l'opéron F3

[304]. La région F3 comprend des gènes flagellaires précoces tels que *fliA*, présent chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, qui contrôle l'expression tardive des gènes de la région F1, tels que les gènes codant la flagelline *FliC* et la protéine de coiffe *FliD* [29,297]. Le gène *fliC*, présent en un seul exemplaire sur le chromosome bactérien, est constitué de 960 pb, correspondant à une séquence de 319 acides aminés [296]. La coiffe des flagelles *FliD*, codée par le gène *fliD*, est constituée de 1 524 pb correspondant à une séquence de 507 acides aminés. Il est intéressant de savoir que les gènes *fliC* et *fliD* sont des gènes cryptiques, présents chez toutes les souches de *C. difficile* qu'elles soient flagellées ou non [305,306]. La région F3 est séparée de la région F1 par une région interflagellaire, connue sous le nom de région F2, et qui, chez la souche 630 de *C. difficile* et les souches du ribotype 017, comprennent quatre gènes de biosynthèse de glycanes flagellaires (Figure 14) [288] [307]. Cependant, les souches épidémiques dites « hypervirulentes » de ribotype 027 (dont R20291) présentent une diversité génétique dans cette région [28,165]. Les quatre gènes présents chez la souche 630 sont remplacés par six gènes chez les souches R20291 et CD196, ainsi que chez d'autres souches comme la souche M120 (PCR ribotype 078) [165]. Cette diversité pourrait expliquer les différences de mobilité entre les souches CD 630 et R20291 [165]. En effet, Stabler et al. ont observé que CD 630 était moins mobile que R20291, alors que le nombre de flagelles observés chez les souches 630 est supérieur à celui de R20291 [165,298]. Par ailleurs, des différences de mobilité entre des souches du même ribotype 027 ont été observées, ce qui rend l'identification de la responsabilité des différences génétiques difficile. Ces résultats contradictoires, et probablement liés à des modifications génétiques, restent à présent mal compris [298] [308]. De même, chez les souches du ribotype 078, la région F2 est complètement absente et cela aboutit à un phénotype immobile [165,296].



Figure 14. Organisation de la région flagellaire F2 à l'aide de la visualisation du génome entier via Artemis [309]. Souches de *C. difficile* : (A) 630, (B) R20291, (C) CD196 et (D) M120. Les boîtes bleues représentent les régions codant des gènes de glycanes flagellaires. Chez 630 (A), la région F2 (encadrée en rouge) comprend les gènes CD0241-CD0244, identifiés comme des gènes de glycanes flagellaires (tableau 3). Chez R20291 et CD196 (B, C), ces gènes sont remplacés par six gènes (encadrés en rouge) dont un appartenant à la famille de glycosyl transférases, et deux gènes non caractérisant aucune protéine, l'un appartient à la famille de carbamoyl phosphate synthétase et l'autre à la famille d'ornithine cyclodéaminase [165].

2.2.3.4 Rôle des flagelles de *C. difficile* dans la colonisation de l'hôte

Les premières études sur le rôles des flagelles dans le processus de colonisation ont montré que la flagelline FliC et la coiffe FliD sont impliquées dans l'adhérence au mucus murin et jouent un rôle important dans la colonisation de *C. difficile* chez l'hôte [296].

Plus récemment, le développement de la technologie de mutation ciblée ClosTron, couplée à celle de l'échange allélique (ACE), a permis de cibler et inactiver des gènes spécifiques de l'opéron flagellaire et d'améliorer la compréhension du rôle des flagelles dans la pathogénicité de *C. difficile* [247,310,311]. Ainsi, l'implication des flagelles dans les derniers stades de la formation du biofilm a pu être mise en évidence [312]. Par ailleurs, l'étude de Baban et al. a montré d'une part que la souche R20291 mutée pour les gènes *fliC* et *fliD* présente une adhérence réduite aux cellules épithéliales intestinales Caco-2, ce qui n'est pas le cas pour la souche *630Δerm*. D'autre part, ils ont montré que les flagelles et la mobilité de la souche *630Δerm* ne sont pas essentiels pour la colonisation chez la souris, ce qui nous permet de conclure que les flagelles ne sont pas essentiels à l'adhérence [298].

Les techniques de séquençage de nouvelle génération ont conduit à la publication des génomes de nombreuses souches de *C. difficile* et ont facilité les études de comparaison du génome. Des études comparatives du génome entier d'isolats de *C. difficile* ont permis d'identifier les différences dans les régions des gènes flagellaires qui pourraient affecter la mobilité et la virulence [165,288]. Ces études ont de nouveau souligné que les flagelles pourraient ne pas être essentiels pour la colonisation et l'adhésion à *C. difficile*. La publication du génome de CD M120 (ribotype 078 ; GenBank FN665653) a confirmé que cette souche ne présente pas la région flagellaire F3, tout en conservant la région F1 [28]. Par ailleurs, des souches non flagellées de *C. difficile* conservent la transcription des gènes *fliC* et *fliD* sans conduire à la synthèse des protéines correspondantes. Enfin, la souche 078, non flagellée, est retrouvée chez les humains et les animaux de ferme tels que les veaux et les porcs et est considérée comme étant une source d'infection communautaire. L'émergence de cette souche en tant que ribotype commun circulant dans les établissements de santé suggère que les souches non flagellées sont tout aussi capables de causer des infections, au même titre que les autres souches flagellées [161–163].

Les données présentées ci-dessus suggèrent que la mobilité induite par les flagelles ne serait pas essentielle à la survie de *C. difficile* et à la colonisation intestinale par la bactérie. Néanmoins, le rôle des flagelles dans la pathogénicité de la bactérie commence à être élucidé, notamment dans l'activation des voies de signalisation de la réponse immunitaire innée [291]. De plus, un lien entre la régulation flagellaire et la production de toxines a été suggéré [304].

2.2.4 Les toxines de *C. difficile*

2.2.4.1 Les toxines TcdA et TcdB

Une fois la croissance des formes végétatives de *C. difficile* établie, les facteurs de virulence majeurs produits par la bactérie sont les deux toxines TcdA (308 kDa) et TcdB (270 kDa) [316].

i. Régulation de l'expression

Les gènes codant les deux toxines sont situés dans une région de 19,6 kb du chromosome, connue sous le nom de locus de pathogénicité ou PaLoc, associés à trois autres gènes, *tcdR*, *tcdE* et *tcdC* (Figure 15) [317], impliqués dans la régulation de la production de toxines et dans leur export extracellulaire [318–320].



Figure 15. Organisation génétique du locus de pathogénicité PaLoc. Le locus PaLoc de 19,6 kb est composé de 5 gènes : les gènes *tcdA* et *tcdB* codant les toxines TcdA et TcdB respectivement (en vert) et les gènes codant un régulateur positif, *tcdR*, un régulateur négatif, *tcdC*, (en rouges) et le gène *tcdE* (en bleu) codant une protéine impliquée dans la sécrétion des toxines. Les flèches indiquent le sens de la transcription. D'après Carter et al [316].

La variabilité des gènes codant les toxines constitue la base de la classification des souches de *C. difficile* selon les toxinotypes [321]. Le gène *tcdR* (appelé précédemment *tcdD* ou *txeR*) code un facteur sigma alternatif régulateur positif de l'expression de *tcdA* et *tcdB*, ainsi que des autres gènes du PaLoc. En effet, TcdR permet la liaison des ARN polymérases aux promoteurs spécifiques des gènes *tcdA* et *tcdB*, activant ainsi directement l'expression des gènes des toxines, ainsi que sa propre expression [318,322]. TcdC est un facteur anti-sigma, qui module l'expression de *tcdA* et *tcdB* en bloquant l'association de TcdR et de l'ARN polymérase centrale. Le rôle de la protéine codée par le gène *tcdC*, est moins clair. Cependant, elle est considérée comme un régulateur négatif de la synthèse de TcdA et TcdB, en raison de la relation inverse entre sa transcription et celle des autres gènes du PaLoc [319,323–325].

Le gène *tcdE* est un gène de 501 pb qui code une holine potentiellement impliquée dans la lyse bactérienne et l'exportation de TcdA et TcdB. Cependant, le rôle de cette protéine reste ambigu. En effet, deux études différentes (Olling et al., et Govind et al.) ont produit des données contradictoires sur la capacité du TcdE à faciliter l'exportation de TcdA et de TcdB. Les gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdR* et *tcdE* sont orientés dans le même sens, tandis que le gène *tcdC* est orienté en sens opposé [320,323,326]. Par ailleurs, l'expression des toxines TcdA et TcdB est précisément régulée par les conditions environnementales et par les régulateurs globaux : glucose, proline et biotine sont des effecteurs qui inhibent la synthèse des toxines, alors que le butyrate et la température de 37 °C sont des effecteurs qui activent leur synthèse [327]. De plus, des expériences in vivo réalisées au sein de notre laboratoire sur un modèle de souris colonisées par *C. difficile* ont montré que l'expression des gènes *tcdA* et *tcdB* augmente tardivement (48 h) après l'infection [328].

Enfin, il faut noter que le locus de pathogénicité PaLoc est retrouvé uniquement chez les souches toxinogènes. Toutefois, les souches non toxinogènes peuvent devenir toxinogènes via des événements de transfert de gènes du locus PaLoc [329–331].

ii. *Structure et mécanisme d'action de TcdA et TcdB*

TcdA et TcdB possèdent environ 66 % de similarité au niveau des acides aminés [332]. Les deux toxines partagent plusieurs domaines conservés selon le modèle ABCD (A, Activity ; B, Binding ; C, Cutting ; D, Delivery) [333,334]. Le domaine A (Activity), situé dans le domaine N-terminal, porte l'activité enzymatique glycosyltransférase responsable de la glycosylation des protéines Rho de la cellule hôte, alors que le domaine B (Binding), situé dans la partie C-terminale, est constitué d'éléments répétitifs d'oligopeptides, appelés CROPs (combined repetitive oligopeptides). Ces peptides présentent des homologies avec des régions de liaison aux sucres, permettant la fixation des glycosyltransférases à leurs cibles sur les domaines de reconnaissance des cholines de certains composants des protéines de surface cellulaire. De plus, les domaines CROPs présentent une grande diversité de séquence entre TcdA et TcdB, tout particulièrement le domaine CROPs de TcdB qui est considérablement plus court que celui de TcdA [335,336]. En outre, le domaine C (Cutting) est constitué d'un domaine auto-catalytique, avec une activité cystéine protéase permettant la libération du domaine A catalytique, en présence d'inositol hexakisphosphate, nommé aussi acide phytique ou acide myo-inositol hexaphosphorique (InsP6). La structure du domaine C de TcdB a été récemment publiée. Ce domaine présente une structure similaire à celle du domaine équivalent de TcdA (56 % d'identité de séquence), avec des sites actifs conservés et le même domaine de liaison à l'InsP6. Enfin, le domaine D (Delivery) correspond à la région hydrophobe interne avec une activité transmembranaire et donc un rôle dans la translocation de la partie active des toxines de l'endosome vers le cytosol [334,337].

Le mode d'action des toxines débute par la reconnaissance et la liaison aux récepteurs via le domaine de liaison au récepteur C-terminal des toxines. TcdA se lie à divers glucides et, de multiples glycolipides et protéines glycosylées aient été proposés comme récepteurs, comme le sucrose-isomaltase, la glycoprotéine 96 (gp96) et les membres de la famille des récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDLR). En outre, les structures glycaniques Gal- α -1,3-Gal- β -1,4-GlcNAc, les glycanes X/Y/I de Lewis et les glycosaminoglycanes sulfatés ont été suggérés comme récepteurs glucidiques pour la TcdA [338,339]. Récemment, trois récepteurs de nature protéique ont été suggérés pour TcdB : la protéine de type récepteur du poliovirus 3 (PVRL3,

également appelée nectine 3), le protéoglycane sulfate de chondroïtine 4 (CSPG4) et les protéines frizzled (FZD). PVRL3 est fortement exprimé à la surface des cellules épithéliales du côlon humain et il a été observé une co-localisation entre PVRL3 et TcdB *in vivo*, dans le tissu d'un patient atteint d'ICD, suggérant que PVRL3 pourrait servir de récepteur initial à TcdB [340]. CSPG4 est fortement exprimé dans les myofibroblastes intestinaux sous-épithéliaux des intestins de souris et humains, suggérant que ce récepteur pourrait être engagé après une lésion initiale de l'épithélium colique [341,342]. Les FZD sont une famille de récepteurs transmembranaires pour les morphogènes Wnt modifiés par des lipides. La liaison de la TcdB aux FZD, en particulier aux FZD1, 2 et 7, permet non seulement l'entrée de la toxine, mais inhibe également la signalisation Wnt qui régule l'auto-renouvellement des cellules souches coliques et la différenciation de l'épithélium colique [343].

La liaison aux récepteurs déclenche l'endocytose des toxines par une voie non caractérisée dépendante de la clathrine et de la dynamine, ce qui entraîne le passage des toxines vers les endosomes précoces au sein de la cellule hôte (Figure 16) [344]. L'acidification du compartiment endosomal induit alors un changement conformationnel des toxines, conduisant à la formation d'une saillie, qui serait impliquée dans l'insertion de la membrane et la formation subséquente des pores dans la membrane endosomale [345]. Les toxines se lient alors à la molécule InsP6 de la cellule hôte, induisant ainsi un changement conformationnel au sein du domaine de la cystéine protéase et conduisant à un clivage autocatalytique en un site situé entre les 2 domaines de la cystéine protéase et de la glycosyltransférase [346,347]. Ce clivage entraîne la libération du domaine glycosyltransférase (N-terminal) de la toxine dans le cytosol de l'hôte. Après leur libération dans le cytosol, les régions N-terminales de TcdA et TcdB inactivent un certain nombre de protéines cellulaires appartenant à la famille Rho des GTPases comprenant RhoA, B, C, G, Rac1–3 et Cdc42. Cette inactivation protéique est assurée par le transfert covalent d'une fraction de glucose à ces protéines [334,348]. Cette glycosylation médiée par la toxine verrouille les GTPases de la famille Rho dans une conformation inactive, affectant en conséquence un certain nombre de voies cellulaires importantes. TcdA et TcdB induisent ainsi une perte d'intégrité structurelle cellulaire due à la dérégulation de la dépolymérisation de l'actine, conduisant à l'apoptose [316,349]. La mort cellulaire conduit alors à une perturbation des jonctions serrées cellulaires au sein de l'épithélium intestinal et à une perte concomitante de la fonction de la barrière épithéliale. Collectivement, ces effets entraînent une augmentation de la perméabilité intestinale et une accumulation du liquide qui se manifeste ensuite par une diarrhée, symptôme caractéristique des ICDs [316].

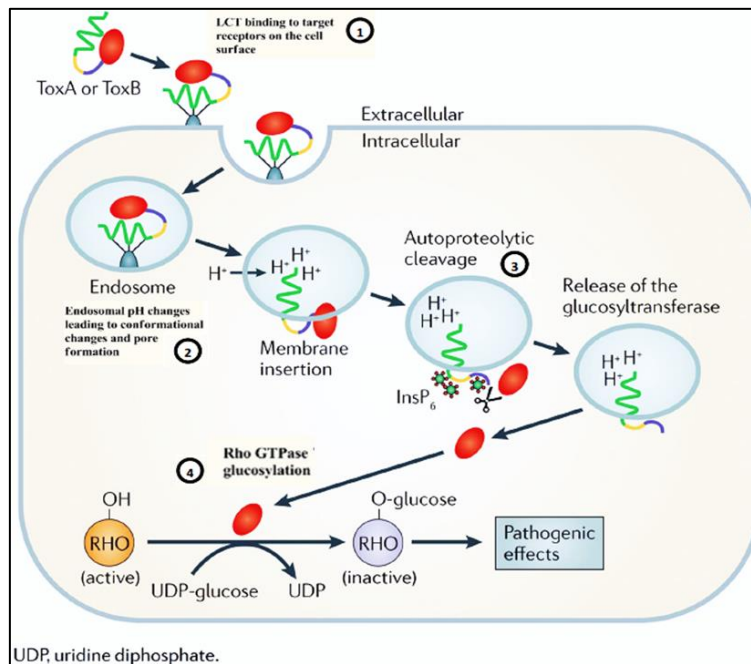


Figure 16. Le mécanisme d'action des deux toxines TcdA et TcdB peut se répartir en 4 étapes. 1) Les toxines se lient à leurs récepteurs à la surface cellulaire par leur domaine B C-terminal et sont ensuite internalisées par endocytose. 2) Une diminution de pH de l'endosome induit un changement structural du domaine transmembranaire par le domaine D, capable de former des pores dans la membrane de l'endosome. 3) Le domaine enzymatique A interagit avec l'InsP₆, un facteur cytosolique, capable d'activer le domaine cystéine protéase C, induisant ainsi un processus autoprotéolytique qui entraîne la libération du domaine glycosyltransférase dans le cytosol. 4) Le domaine catalytique va inactiver les protéines Rho GTPases par l'incorporation irréversible d'un glucose. L'inactivation de ces protéines, qui contrôlent de nombreuses voies de signalisation cellulaire dont celles de la régulation du cytosquelette d'actine, aboutit à la mort cellulaire. D'après Davies et al [333].

iii. Toxicité de TcdA et TcdB

L'émergence d'épidémies dues aux différentes souches de *C. difficile*, notamment de ribotype BI/NAP1/027, associée à des taux très élevés de morbidité et de mortalité, a nécessité l'étude précise des mécanismes de virulence, et en particulier les rôles respectifs de TcdA et TcdB.

Ainsi par exemple, la toxine TcdB produite par les souches BI/NAP1/027 présente des caractéristiques plus cytotoxiques que la toxine TcdB produite par d'autres souches. Ces différences phénotypiques permettent à la toxine de provoquer des dommages plus graves et plus étendus chez l'hôte après l'infection par ces souches particulières de *C. difficile* [350,351].

Par ailleurs, pendant de nombreuses années, TcdA a été présumée être le principal facteur de virulence de *C. difficile*. Cette hypothèse est fondée sur plusieurs études qui ont montré que l'administration intragastrique de TcdA à des hamsters a entraîné des symptômes d'ICD, notamment une inflammation intestinale, une diarrhée et éventuellement la mort. En revanche, aucun symptôme de maladie n'a été observé chez les hamsters suite à l'administration de TcdB,

à moins que des concentrations sublétales de TcdA aient été co-administrées [352]. Le résultat d'une autre étude réalisée chez le lapin a soutenu ces conclusions, avec l'observation que l'administration de TcdA purifiée entraînait une hémorragie, une nécrose cellulaire et une augmentation de la perméabilité intestinale, contrairement à l'administration de TcdB. En outre, une forte réponse humorale contre TcdA est suggérée comme un indicateur important de la réduction de la gravité des ICDs et de la rechute chez l'Homme [353,354].

L'importance de TcdA dans le développement des ICDs a été remise en question à la suite de l'émergence de souches pathogènes de *C. difficile* produisant seulement TcdB. Ces souches ont provoqué le spectre clinique complet des ICDs, certaines études suggérant même que ces souches ont causé une maladie plus grave que les souches produisant à la fois TcdA et TcdB [321]. Contrairement aux données obtenues en présence des toxines purifiées, l'isolement de ces souches variantes a suggéré que TcdA n'était pas essentielle pour l'apparition des symptômes des ICDs et que les souches ne produisant que TcdB étaient aussi virulentes que les souches libérant les deux toxines. Par conséquent, ces études suggèrent que TcdB jouerait un rôle qui semble être crucial dans la manifestation de la maladie. En effet, il a été montré que TcdB induit une réponse inflammatoire aiguë et cause des dommages plus graves que TcdA au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris portant des explants intestinaux humains [355]. Dans ce modèle, TcdB était capable de provoquer des symptômes d'ICDs en l'absence de TcdA. Des études sur un modèle d'embryon de poisson ont également montré la capacité de TcdB à provoquer des dommages à l'hôte en l'absence de TcdA, avec des lésions tissulaires systémiques, en particulier au niveau du cœur. Ces résultats montrent clairement que TcdB peut provoquer des effets systémiques chez l'hôte. De même, Lyras et al. proposent que TcdB serait le principal facteur de virulence de la souche 630 [356,357].

Récemment, la première souche possédant un gène *tcdA* intact, dans un environnement génomique différent de celui de PaLoc, mais sans gène *tcdB*, a été caractérisée. Ce travail a soulevé l'hypothèse que les locus codant une seule toxine pourraient avoir fusionné pour former le locus typique à deux toxines (PaLoc), qui est la forme la plus couramment détectée actuellement dans les isolats cliniques. Cependant, il convient de noter que les cas cliniques confirmés d'ICD provoqués par des souches qui ne produisent que TcdA sont extrêmement limités [358].

2.2.4.2 La toxine binaire

La toxine *Clostridioides difficile* transférase (CDT), également connue sous le nom de toxine binaire, est retrouvée avec une forte prévalence chez les souches de *C. difficile* couramment associées aux ICDs très graves, telles que les souches B1/NAP1/027 et du ribotype 078 [359,360]. CDT a été décrite pour la première fois en 1988 chez la souche CD196 non épidémique [161] et appartient à la famille des toxines ADP-ribosylantes binaires, et plus spécifiquement de la sous-famille de type iota-like des toxines binaires qui comprend également la toxine iota de *C. perfringens* (i-toxine) et la toxine C2 de *C. spiroforme* (CST) [216]. Cette toxine est appelée « binaire » car elle est composée de deux sous-unités, d'une part la sous-unité catalytique (CDTa) de 48 kDa, qui confère l'activité ADP ribosyltransférase spécifique de l'actine, et d'autre part, la sous-unité de liaison/translocation (CDTb) de 74 kDa qui permet le passage du composant enzymatique au cytosol cellulaire. Chez les souches productrices de CDT, les gènes codant CDTa et CDTb, *cdtA* et *cdtB*, respectivement, sont situés sur une région génomique de 6,2 kb appelée locus CDT, ou CDTLoc, qui code également un régulateur positif de la production de CDT (*CdtR*). Les gènes codant la toxine sont toujours présents chez certaines souches PCR ribotypes épidémiques, comme les souches 027 et 078 [361–364].

CDT est un déterminant associé à la virulence mais son rôle dans la pathogenèse de la maladie reste non confirmé. Toutefois, le mécanisme d'action de CDT est suggéré comme étant similaire à celui de la toxine iota. En effet, lors de l'activation par des protéases de type sérine, la forme monomérique de CDTb se lie à la lipoprotéine stimulée par le récepteur de la lipolyse (LSR), un récepteur de surface cellulaire retrouvé dans de nombreux tissus, y compris le foie et l'intestin [365–367]. Une fois lié au LSR, CDTb s'oligomérisse dans les radeaux lipidiques de la membrane cellulaire, provoquant la liaison du composant enzymatique, CDTa [368]. Ce complexe est ensuite internalisé dans le compartiment endosomal, déclenchant une insertion membranaire de CDTb qui est ensuite suivie de la formation des pores, permettant la translocation de CDTa, dans le cytosol [369]. Une fois dans le cytosol, CDTa conduit à la ribosylation de l'actine, avec l'inhibition de la polymérisation de la G-actine et l'induction de la dépolymérisation de la F-actine, entraînant la destruction complète du cytosquelette d'actine et, finalement, la mort cellulaire [370]. Bien que la description du mécanisme d'action de CDT dans les cellules soit définie, comme nous l'avons déjà mentionné, le rôle de cette toxine dans la pathogenèse de la maladie reste toujours mal élucidé. Cependant, des travaux récents ont montré que CDT induit la formation d'un réseau de saillies, composé de microtubules, développé à la surface des cellules épithéliales du côlon [371]. Ces saillies induites par CDT

contiennent des vésicules mobiles, ce qui induirait le déroutement des vésicules contenant de la fibronectine de la surface basolatérale à la surface apicale des cellules épithéliales intestinales, où les saillies sont formées. La fibronectine ainsi libérée améliorerait l'adhérence des bactéries [372]. Ainsi, il a été suggéré que cette toxine est impliquée dans l'adhésion de *C. difficile* et la colonisation de l'hôte [371,372]. Néanmoins, des souches qui n'expriment naturellement que la toxine CDT se sont révélées non virulentes dans un modèle de hamster [373], suggérant que CDT seule est incapable de provoquer une infection intestinale sans les deux toxines TcdA et TcdB, et qu'elle pourrait agir en synergie avec les principales toxines pour induire une maladie plus sévère [373]. À ce jour, la présence de la toxine binaire corrélée à des cas graves d'ICDs laisse supposer que la toxine binaire peut potentialiser la toxicité de TcdA et TcdB et ainsi induire une forme plus grave de la maladie [363].

Enfin, de nombreuses études ont également montré une corrélation entre les souches productrices de CDT, y compris de différents ribotypes, et l'augmentation du taux de mortalité chez les patients atteints d'ICD [374,375]. Pourtant, la détection de CDT dans des échantillons cliniques est actuellement limitée car aucun test de diagnostic fiable n'est disponible. Le véritable impact de CDT sur la morbidité et la mortalité au cours des ICDs est donc probablement sous-estimé. A noter que la toxine binaire est exprimée par environ 20 % des souches. En outre, cinq cas d'ICDs probablement liés à des souches ne produisant pas les toxines TcdA et TcdB, mais seulement la toxine CDT, ont été décrits en France [364].

2.3 La réponse de l'hôte contre *C. difficile*

2.3.1 La réponse immunitaire innée contre *C. difficile*

L'infection aiguë par *C. difficile* se caractérise par une forte réponse inflammatoire, et la réponse immunitaire innée est en première ligne [376]. Récemment, il a été démontré que l'infection par *C. difficile* est souvent caractérisée par des niveaux élevés de cytokines pro inflammatoires, telles que les IL-1 β , IL-8, IL-23 et IFN γ [377,378].

La libération d'IL-1 β et d'IL-8 dépend de l'activation des voies de signalisation inflammatoires en réponse aux déterminants de pathogénicité de *C. difficile*, aboutissant au recrutement de neutrophiles, de monocytes et d'éosinophiles [379–381]. Ces dernières cellules jouent également un rôle important dans la protection contre l'ICD puisque, bien que les

mécanismes d'action restent inconnus, elles contribuent à réparer les lésions tissulaires causées par l'activité des neutrophiles [382–384]. Ce rôle important des éosinophiles est d'autant plus remarquable que ces cellules immunitaires sont plutôt caractéristiques de l'immunité de type 2, une réponse qui est le plus souvent associée aux infections helminthiques, à l'allergie et à l'asthme [385–387]. D'autre part, le recrutement de neutrophiles dans le côlon est essentiel à la protection de l'hôte en participant directement à la clairance des bactéries par phagocytose et libération de facteurs microbicides [30]. Leur rôle essentiel a été démontré chez des souris dépourvues de réponse efficace de neutrophiles, lesquelles présentent une gravité de la maladie et une mortalité accrues durant l'infection à *C. difficile* [388].

L'IL-23, une puissante cytokine pro-inflammatoire, est induite en aval de la signalisation TLR et IL-1R par les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 [389]. Dans le côlon, les granulocytes et les monocytes représentent probablement les principaux producteurs de cette cytokine, qui induit à son tour la production d'IL-1 β , d'IL-17, d'IL-6 et de TNF- α , elles aussi puissantes cytokines pro-inflammatoires [389,390]. A travers la production de ses médiateurs, l'IL-23 joue un rôle dans l'induction des cellules Th17, qui jouent un rôle dans les infections bactériennes, l'auto-immunité et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [390]. De plus, l'infection à *C. difficile* favorise, par le biais de l'interaction entre la couche S et le TLR4, la libération de d'IL-10 et d'IL-4, qui stimuleraient la maturation des cellules B naïves en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines et en cellules B mémoire spécifiques [220]. Les protéines de couche S activent également les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) pour la production d'IL-12, d'IL-23 et d'IL-10 en activant la voie de signalisation p38 des MAPKs [220].

Les facteurs majeurs de virulence de *C. difficile*, les toxines TcdA et TcdB, activent les voies de signalisation des MAPK et de l'inflammasome pyrine [391,392]. Par ce biais, TcdA et TcdB peuvent stimuler une réponse pro-inflammatoire avec la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-8, TNF- α et IL-6) [393,394] et induire l'apoptose des cellules épithéliales intestinales [395]. Cet effet des toxines est médié, en partie, par l'activation de la voie des MAPKs qui, à leur tour, activent les voies de signalisation de NF- κ B. La production d'IL-8 est également déclenchée par le stress cellulaire et la libération d'UDP, un signal de danger putatif et un ligand du récepteur P2Y6, induits par TcdA et TcdB ou TcdB seule [392,396]. TcdA et TcdB peuvent également contribuer à la formation et l'activation de l'inflammasome pyrine à la suite d'une inactivation des GTPases de la famille

Rho. Cela conduit au clivage des pro-IL-1 β et pro-IL-18 pour libérer les formes actives de ces cytokines par les pores formés dans la membrane plasmique (Cf. 3.3.6 L'inflammasome pyrine) [394]. Comme indiqué précédemment, l'IL-1 β et l'IL-18 sont de puissantes cytokines pro-inflammatoires capables d'entraîner le recrutement de cellules immunitaires innées nécessaires à la clairance des pathogènes [397]. Cowardin et al. (2015) ont montré que les toxines TcdA et TcdB n'induisent pas la libération d'IL-1 β et IL-23 dans des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC). En revanche, en combinaison avec des filtrats bactériens ou des motifs moléculaires de type PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) ou DAMPs (Danger associated molecular patterns), elles sont capables d'augmenter significativement les niveaux de ces cytokines pro-inflammatoires [381]. Le même résultat a été obtenu avec des PAMPs non associés à *C. difficile*, comme le LPS, qui est spécifiquement reconnu par le TLR4. En l'absence de PAMPs ou de DAMPs supplémentaires, les toxines ont cependant entraîné une augmentation de la transcription du gène IL23, suggérant que l'augmentation de la production d'IL-23 peut être due à l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires, notamment de NF- κ B [381].

Parmi les facteurs de pathogénicité de *C. difficile*, les flagelles, et plus particulièrement les monomères de flagelline, sont reconnus spécifiquement par le TLR5 et induisent une réponse immunitaire innée. Yoshino et al. (2013) ont montré dans des cellules rénales transfectées par le TLR5 et des cellules épithéliales intestinales HT29 et Caco-2 que la flagelline purifiée d'une souche de *C. difficile* induit l'activation de la MAPK p38 ainsi que de NF- κ B, aboutissant à la production de différentes cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-8 et CCL20. Ils ont également observé une amplification de cette production de cytokines à la suite d'un prétraitement par la toxine TcdB. Ces auteurs ont conclu que la flagelline de *C. difficile* pouvait jouer un rôle dans la pathogénèse de l'ICD [219].

Dans ce sens, au sein de notre équipe de recherche, Batah et al. (2016) ont montré que la flagelline de *C. difficile* active non seulement les voies de signalisation de NF- κ B et de p38, mais également celle des MAPKs ERK1/2 et JNK, dans des modèles cellulaires exprimant le TLR5 humain. Ils ont mis en évidence l'impact prédominant de l'inhibition de NF- κ B sur la production d'IL-8 par les cellules stimulées par FliC, et donc le rôle essentiel de NF- κ B dans la production d'IL-8, d'IL-6 et de MCP-1 par les cellules épithéliales [291,398]. La même équipe a étudié in vivo le rôle de FliC dans la réponse inflammatoire de la muqueuse intestinale dans un modèle murin d'ICD. Ils ont démontré une synergie entre la flagelline et les toxines TcdA

et TcdB de *C. difficile* dans l'induction d'une forte réponse inflammatoire intestinale. En effet, les toxines produites au niveau de la muqueuse pourraient altérer le cytosquelette cellulaire et ouvrir les jonctions serrées épithéliales, exposant alors le TLR5 exprimé au pôle basolatéral des cellules [398].

2.3.2 La réponse immunitaire adaptative contre *C. difficile*

L'infection à *C. difficile* déclenche également une réponse immunitaire adaptative, avec la production d'anticorps dirigés contre différents produits bactériens, en particulier les toxines et les protéines de surface. Les toxines TcdA et TcdB induisent toutes deux une réponse immunitaire humorale qui, malgré la structure similaire de ces deux protéines, semble spécifique. En effet, il a été montré que le sérum de souris immunisées spécifiquement avec TcdA, ou TcdB, ne contenait que de très faibles taux d'anticorps dirigés contre l'autre toxine [399]. La présence fréquente d'anticorps dirigés contre les toxines de *C. difficile* dans la population a été largement décrite : entre 50 et 70 % des adultes en bonne santé possèdent des anticorps sériques IgG et IgA contre TcdA ou TcdB [400,401]. Les protéines de surface de *C. difficile* sont également capables d'induire une réponse immunitaire adaptative. Les protéines flagellaires FliC et FliD et les protéines associées à la surface Cwp66 et Cwp84 se sont également révélées immunogènes. Des anticorps dirigés contre ces protéines ont été détectés après le diagnostic d'une ICD et pendant les 2 semaines suivantes [264,376].

L'importance de cette réponse immunitaire adaptative pourrait influencer l'issue de la colonisation et de l'ICD. Il a en effet été montré un lien entre les taux d'immunoglobulines sériques dirigés contre des antigènes de *C. difficile* et la sévérité de l'infection ou le risque de développer une rechute. D'autre part, certaines classes d'immunoglobulines semblent plus importantes que d'autres dans l'induction de cette immunité contre *C. difficile*. Les IgA jouent un rôle essentiel dans l'immunité muqueuse et donc dans la protection contre la bactérie au sein de la lumière intestinale. En effet, une diminution des cellules productrices d'IgA au niveau colique, ainsi que des faibles taux d'IgA fécales, ont été associés à des symptômes prolongés de l'ICD et à une récurrence de l'infection [401,402]. La forte production d'IgM, qui sont les immunoglobulines les plus précoces, dirigées contre les toxines ou des protéines de surface de *C. difficile* semblent être un facteur de bon pronostic. Des patients possédant des concentrations élevées d'IgM sériques anti-TcdA ou anti-TcdB, entre autres, dans les trois jours suivant l'apparition de la diarrhée, semblaient ne pas présenter de récurrence [353]. D'autre part, des patients possédant cette fois-ci une faible réponse IgM anti-SLPs (protéines de couche S)

présentaient un risque de récurrence 25 fois supérieur à celui des patients possédant une forte réponse [403]. Les IgG, et en particulier celles dirigées contre les toxines, sont également impliquées dans la protection contre le développement de l'ICD [404,405]. Cependant, une réponse naturelle élevée en anticorps antitoxines ne protège pas toujours contre les ICD symptomatiques.

3 Les inflammasomes et l'immunité innée

Les inflammasomes sont des complexes moléculaires de signalisation multimérique cytosoliques découverts en 2002. Ce sont des effecteurs essentiels de l'immunité innée chez les mammifères [406]. Les inflammasomes ont été principalement étudiés chez des macrophages, mais ont également été décrits dans d'autres cellules myéloïdes, notamment les cellules dendritiques et les neutrophiles, ainsi que dans les cellules cancéreuses et dans les cellules épithéliales intestinales [407–410].

3.1 Les récepteurs de la réponse immunitaire innée

La formation des inflammasomes est initiée par les récepteurs de reconnaissance ou *pattern recognition receptors* (PRR), qui sont capables de détecter 1) les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes ou PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), molécules de nature variable (protéines, acides aminés, lipides, fragments d'ADN ou d'ARN) issues habituellement d'agents infectieux (bactéries, virus, champignons, levures), 2) les molécules associées aux dangers ou DAMPs (*Danger associated molecular patterns*) et 3) les molécules modifiant l'homéostasie ou HAMPs (*Homeostasis-altering molecular processes*) [411,412]. Les PRR comprennent, entre autres, les récepteurs de type Toll (TLR, *Toll-like receptor*) et les récepteurs de type NOD (NLR, *NOD-like receptor*), que nous détaillons ci-dessous, ainsi que les récepteurs AIM2 (*absent in melanoma 2*, ALR) et la pyrine [411,413].

3.1.1 Les Toll-like receptors (TLR)

Chez les mammifères, 13 TLRs différents ont été identifiés (TLR1 à 11 chez l'Homme, TLR1-9 et TLR11-13 chez la souris) avec peu de différences fonctionnelles observées entre ces deux espèces. D'une manière générale, les TLRs qui reconnaissent spécifiquement des produits bactériens, tels que les TLR1 et TLR6 (qui reconnaissent des lipoprotéines di et tri-acylées), le TLR2 (qui reconnaît des lipoprotéines, des peptidoglycanes, des acides lipotéichoïques), le TLR4 (qui reconnaît le lipopolysaccharide - LPS) et le TLR5 (qui reconnaît les flagellines bactériennes), sont des récepteurs transmembranaires exprimés sur la membrane des cellules immunitaires et des cellules épithéliales intestinales. En revanche, les TLRs qui reconnaissent des acides nucléiques, tels que les TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 et TLR13, sont exprimés exclusivement sur la membrane des compartiments intracellulaires. Le récepteur TLR4 est cependant exprimé à la fois sur les membranes cellulaires (signalisation pro-

inflammatoire) et intracellulaires (signalisation anti-inflammatoire) [414–416]. Chaque TLR est composé d'un domaine extracellulaire riche en leucine responsable de la reconnaissance des PAMPs, des DAMPs ou des HAMPs, un domaine transmembranaire et un domaine du récepteur Toll-IL-1 (TIR) cytoplasmique responsable de l'initiation de la cascade de signalisation cellulaire. Le domaine TIR peut recruter (lors de l'activation du TLR spécifique) des adaptateurs différents tels que MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β*), TIRAP / MAL (*TIR domain containing adaptor protein*) et TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), qui sont ensuite responsables d'une réponse biologique spécifique [416–418].

3.1.2 Les Nod-like receptors (NLR)

Contrairement aux TLR liés à la membrane, qui détectent les PAMPs à la surface des cellules ou dans les endosomes, les NLR reconnaissent les molécules microbiennes dans le cytosol de l'hôte [419,420]. La famille NLR est composée de 23 membres chez l'homme, alors que le génome de la souris contient au moins 34 gènes de NLR [421]. Des homologues des NLR sont présents dans les plantes (gènes R) et les animaux, y compris des organismes phylogénétiquement plus primitifs tels que le poisson zèbre et l'oursin, bien qu'ils ne soient pas retrouvés chez les insectes ou les vers [422,423].

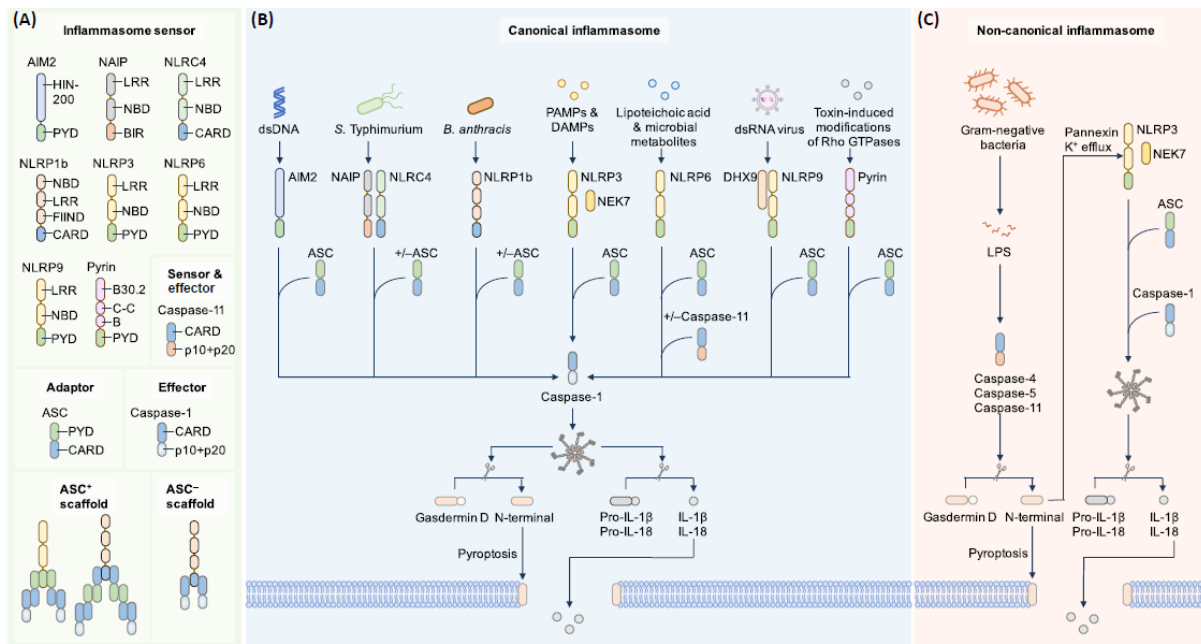
NOD1 et NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain 1 and 2*) ont été les premiers NLR identifiés [424]. Ils détectent tous deux des molécules bactériennes produites lors de la synthèse, la dégradation et le remodelage du peptidoglycane (PGN), composant majeur des parois cellulaires bactériennes. NOD2 détecte le muramyl dipeptide (MDP), retrouvé dans presque toutes les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, tandis que NOD1 reconnaît les fragments de PGN contenant de l'acide γ -D-glutamyl-méso-diaminopimélique (iE-DAP) de la plupart des bactéries à Gram négatif et de certaines bactéries à Gram positif [425]. En réponse à leurs agonistes microbiens, NOD1 et NOD2 induisent l'activation de NF- κ B et des MAPK qui pilotent la transcription de nombreux gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées et adaptatives [426–428].

En revanche, plusieurs NLR dont NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4*, également appelé IPAF), NLRP1, NLRP3 (*NACHT, LRR, FIIND, CARD domain and PYD domains-containing proteins*) et NAIP (*NOD-like receptor family apoptosis inhibitory protein*) sont impliqués dans l'assemblage des inflammasomes, responsables de l'activation de la caspase-1 [429].

3.2 Voies de signalisation des inflammasomes

Lors de la détection d'un PAMP, certains PRR recrutent la protéine adaptatrice associée à l'apoptose (ASC, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). ASC contient deux domaines : un domaine pyrine (PYD, *pyrin domain*) et un domaine d'activation et de recrutement des caspases (CARD, *caspase-activation and recruitment domain*), qui, par des interactions homotypiques CARD-CARD, permettent à ASC de coupler le PRR à la caspase-1. Alternativement, les PRR contenant un CARD peuvent se lier directement au domaine CARD de la caspase-1 et former ainsi un complexe d'inflammasome sans ASC [430] (Figure 17).

Une fois, la caspase-1 activée, elle clive protéolytiquement les procytokines pro-inflammatoires pro-IL-1 β , pro-IL-18 et pro-IL-33 dans leurs formes matures IL-1 β , IL-18, IL-33 [430,431]. Les caspases associées à l'inflammasome (caspases-1, -4, et -5 humaines, et caspases-1 et -11 murines) ont la capacité de médier le clivage et l'activation de la protéine porogène gasdermine D (GSDMD), libérant un domaine N-terminal qui s'oligomérisse dans la membrane plasmique de l'hôte pour provoquer le phénomène de pyroptose (forme de mort cellulaire inflammatoire programmée) dans les macrophages, les neutrophiles et d'autres cellules [407,432–434]. L'oligomérisation des domaines N-terminaux de la gasdermine conduit à la formation de pores, au ballonnement cellulaire et à la libération du contenu cytoplasmique, y compris des cytokines IL-1 β , IL-18, et IL-33 biologiquement actives, qui génèrent une réponse inflammatoire chez l'hôte [435–440]. La figure 16 résume les cascades d'activation canonique et non canonique des inflammasomes.



Trends in Immunology

Figure 17. Voies d'activation des inflammasomes. (A) Les détecteurs de PAMPs sont des protéines cytosoliques qui contiennent un domaine pyrine (PYD) et/ou un domaine d'activation et de recrutement de caspase (CARD). Ils peuvent également contenir un domaine de répétition riche en leucine (LRR), un domaine de liaison aux nucléotides (NBD), un domaine HIN-200, un domaine B30.2, un domaine enroulé (CC), un domaine B-box (B), un domaine de recherche de fonction (FIIND) ou un domaine de baculovirus « inhibiteur de répétition d'apoptose » (BIR). Les sensors d'inflammasomes contenant un PYD peuvent recruter la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) pour médier les interactions CARD-CARD avec la pro-caspase-1 (représentés par les « scaffold » ASC positif). Cependant, NLRC4 et NLRP1b murin contiennent un CARD et peuvent interagir directement avec la caspase-1 sans besoin d'ASC (représenté par « scaffold » ASC négatif). (B) L'activation canonique de l'inflammasome se produit en réponse à des motifs moléculaires PAMPs, DAMPs et HAMPs. La caspase-1 activée clive la gasdermine D (GSDMD) pour libérer le domaine N-terminal (GSDMD-NT) qui induit la pyroptose. La caspase-1 clive également la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 pour former leurs formes actives qui sont libérées à travers les pores. (C) Le lipopolysaccharide (LPS) cytosolique libéré par les bactéries à Gram-négatif est détecté par la caspase-11 murine ou les caspase-4 et -5 humaines, conduisant à une activation non canonique de l'inflammasome. Ces caspases activées clivent ensuite la GSDMD et provoquent une pyroptose. De plus, la GSDMD-NT active l'inflammasome NLRP3 qui induit ensuite la maturation des cytokines pro-inflammatoires d'une manière similaire à celle de la voie canonique de l'inflammasome. Abréviations : AIM2, absent in melanome 2 ; B. anthracis, Bacillus anthracis ; DHX9, DEAH-box helicase 9 ; NAIP, NOD-like receptor family apoptosis inhibitory protein ; NEK7, NIMA-related kinase 7 ; S. Typhimurium, sérovar Salmonella enterica Typhimurium [441].

3.3 Les inflammasomes

Dans ce chapitre, nous décrivons un certain nombre d'inflammasomes, en terminant par l'inflammasome NLRC4 qui, faisant l'objet des recherches présentées dans ce manuscrit de thèse, sera particulièrement détaillé.

3.3.1 L'inflammasome NLRP3

NLRP3 contient en C-terminal un domaine de répétition riche en Leucine (LRR, *leucine-rich-repeat domain*), un domaine central de liaison aux nucléotides (NBD, *nucleotide-binding domain*), et un domaine pyrine (PYD, *pyrin domain*) en N-terminal (Figure 16). Les membres NLRP3 de la famille NLR (également connu sous le nom de cryopyrine, CIAS1 et Nalp3) peuvent activer la caspase-1 en réponse à un certain nombre de stimuli divers, notamment l'ATP, les cristaux d'urate monosodique (MSU), les toxines bactériennes porogènes et les agents pathogènes [442,443]. Lors de son activation, NLRP3 recrute la molécule adaptatrice ASC par une interaction des domaines pyrine-pyrine ; ASC recrute alors la caspase-1 par des interactions CARD-CARD, formant ainsi l'inflammasome NLRP3 [444]. Cette activation exerce des perturbations cellulaires induites par la formation de pores de la membrane plasmique et des flux ioniques, ainsi que par un dysfonctionnement mitochondrial [442]. Ces perturbations sont également liées à la pathogenèse de maladies caractérisées par des inflammations, comme l'athérosclérose causée par un dépôt de cristaux de cholestérol, la silicose et l'asbestose causées par la silice et l'amiante, respectivement, qui sont considérées comme des activateurs exogènes de NLRP3 [445–447].

L'activation de NLRP3 dépend de deux étapes, définies par une étape d'amorçage et une étape d'activation. L'étape d'amorçage initiale induit une régulation positive de NLRP3. Dans les macrophages humains et murins, cette étape nécessite la reconnaissance des PAMP et/ou des DAMP par les PRR, y compris les TLR et les NLR NOD1 et NOD2, ou nécessite une stimulation des cytokines via le récepteur de l'IL-1 (IL-1R) et les récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF) TNFR1 et TNFR2 [448].

Plusieurs médiateurs facilitant la transduction du signal de ces récepteurs ont été décrits, notamment la protéine adaptatrice MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), les interleukines kinases 1 associées aux récepteurs IRAK1 et IRAK4, la kinase de régulation du signal d'apoptose ASK1 et ASK2, la protéine FADD (*Fas-associated protein with death domain*), la caspase-8, l'ubiquitine lié à la protéine SHARPIN et la protéine TIFA (*TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain*) [448–454]. Ces composants de signalisation conduisent finalement à la transcription des gènes humains et murins codant NLRP3 et IL-1 β , préparant ainsi la cellule à répondre aux activateurs de NLRP3 [448].

L'activation de NLRP3 est étroitement régulée par des modifications post-traductionnelles [442]. La protéine E3 ubiquitine ligase contenant un motif tripartite TRIM31 (*tripartite motif-containing protein 31*) et MARCH7 (*membrane-associated ring-CH-type finger*) chez la souris peuvent réguler négativement NLRP3 par ubiquitination, alors que l'ubiquitine ligase E3 Pellino2 favorise l'activation de NLRP3 dans les macrophages humains et murins [455–457]. La phosphorylation est une autre modification critique impliquée dans la régulation de NLRP3. La protéine kinase A inhibe l'activation de NLRP3 en phosphorylant le domaine NBD (*nucleotide binding domain*), alors que la phosphorylation de NLRP3 par la protéine kinase D au même résidu favorise son activation en réponse au diacylglycérol accumulé au Golgi dans les monocytes humains et les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDMs) [458–460]. Des études complémentaires ont suggéré que les NLRP3 humain et murin peuvent être régulés négativement par sumoylation [461]. Ces modifications post-traductionnelles mettent en évidence la régulation complexe qui régit l'activation et l'inhibition de NLRP3 [442].

Le modèle de canal ionique activé est lié à l'activation de NLRP3 par plusieurs mécanismes : l'ATP (adénosine triphosphate) extracellulaire provenant d'agents pathogènes microbiens active le récepteur P2X7 (P2X7R) et permet l'efflux d'ions de potassium intracellulaire (K^+) entraînant l'activation de NLRP3 [462,463].

NLRP3 peut être activé par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, détecté par le récepteur sensible au calcium dans les BMDMs murins. L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire se retrouve également dans les mononucléaires du sang périphérique (PBMC) de patients atteints du syndrome périodique associé à la cryopyrine (CAPS, *cryopyrin-associated periodic syndrome*), groupe de maladies auto-inflammatoires rares et hétérogènes caractérisées par une inflammation systémique médiée par l'IL-1 β et des symptômes cliniques touchant la peau, les articulations, le système nerveux central et les yeux [464]. Une perturbation de l'homéostasie mitochondriale du Ca^{2+} contribuerait également à l'activation de NLRP3 pendant l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* des cellules épithéliales primaires des voies respiratoires humaines [465]. En revanche, l'influx de Ca^{2+} est indispensable pour l'activation de NLRP3 dans les macrophages murins et les cellules dendritiques ; cependant, cet influx se produit à la suite de l'activation de la caspase-1 [466]. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes exacts de la façon dont la fluctuation ionique peut médier l'activation de NLRP3.

Un certain nombre de toxines bactériennes porogènes (comme celles de *Streptococcus* du groupe B) peut également provoquer une dérégulation des ions cellulaires et une activation de NLRP3 [467]. De plus, la liaison médiée par le domaine LRR de NLRP3 avec des protéines régulatrices, telles que la protéine SGT1 (*suppressor of the G2 allele of Skp1*) associée à l'ubiquitine ligase et la protéine de choc thermique 90 (HSP90) peuvent également réguler l'activité de NLRP3 [468].

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées par les mitochondries sont considérées comme un signal d'alarme induit par le stress cellulaire et peuvent déclencher l'activation des inflammasomes NLRP3. Le modèle ROS est basé sur des observations montrant que NLRP3 est activé lors de dommages mitochondriaux et de la libération de ROS [469]. Ainsi, par exemple, l'ADN mitochondrial oxydé (ADNmt) provenant des mitochondries endommagées par une infection bactérienne, ou par d'autres moyens, peut se lier et activer NLRP3 [470]. Ce phénomène serait régulé négativement par la protéine anti-apoptotique Bcl2, suggérant un lien entre l'apoptose et l'activation de l'inflammasome. Récemment, les protéines GBP5 (*guanylate-binding protein 5*) et PKR (*dsRNA-dependent protein kinase*) ont été proposées comme jouant un rôle essentiel dans l'activation de NLRP3. GBP5 interagit avec le domaine pyrine de NLRP3 et aide à l'oligomérisation de l'inflammasome [471]. Il a également été démontré que la PKR s'autophosphoryle lors de la stimulation des macrophages avec les ligands de NLRP3 et ensuite se lier à NLRP3 (ainsi qu'à NLRP1b, NLRC4 et AIM2) [472]. Ainsi, la PKR peut activer directement l'inflammasome NLRP3 et médier la libération de cytokines pro-inflammatoires lorsqu'elle est stimulée par de nombreux ligands, y compris les pathogènes bactériens. Il n'est cependant pas clair comment la phosphorylation de PKR conduit à l'activation de l'inflammasome lors d'une infection. Étant donné que de nombreux activateurs de NLRP3 entraînent également une inhibition de la synthèse des protéines, il a pu être constaté que le blocage direct de la fonction ribosomique conduit à l'activation de l'inflammasome [473].

L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3 commence par un signal, piloté par plusieurs classes de récepteurs, qui facilitent la régulation à la hausse de NLRP3 et la pro-interleukine IL-1 β . Un signal d'activation est ensuite initié par des motifs moléculaires PAMP, qui induisent des changements physiologiques détectés par NLRP3 suivi du recrutement de la protéine ASC et de la caspase-1 pour former un complexe inflammasome [429,444]. La kinase 7 humaine et murine liée à NIMA (NEK7) est un partenaire de liaison de NLRP3, NEK7 se liant aux domaines LRR et NBD de NLRP3. Dans la conformation active du complexe NEK7-

NLRP3, NEK7 interagit avec une molécule de NLRP3 voisin pour faciliter l'oligomérisation des protéines NLRP3. Cependant, le complexe NEK7-NLRP3 ne semble pas suffisant pour conduire à l'activation de l'inflammasome NLRP3, des effecteurs supplémentaires étant nécessaires à déclencher ce processus [474].

L'activation non canonique de NLRP3 se produit en réponse au LPS intracellulaire, initiée par la liaison du fragment lipide A du LPS hexa-acylé à la caspase-11 de souris ou aux orthologues humains caspase -4 et -5 [475,476] (Figure 16C). Ces caspases clivent la GSDMD, conduisant à la génération de pores sur la membrane plasmique et à un efflux de K^+ , déclenchant enfin l'activation de l'inflammasome NLRP3 [432,433,477,478]. Il a également été suggéré qu'en réponse au LPS cytosolique, la caspase-11 clive le canal membranaire pannexine-1 (Panx1), induisant la libération d'ATP et la pyroptose médiée par P2X7 (*P2 purinoceptor 7*). Il est à noter que les BMDMs murins dépourvus de Panx1, et donc dépourvus de l'axe caspase-11-pannexine-1, peuvent encore induire un efflux de K^+ et une activation de NLRP3 indépendamment de P2X7 [479]. Les membres de la protéine GBP de liaison au guanylate et de la GTPase IRG (*immunity-related GTPase*) peuvent cibler et détruire les vacuoles contenant des agents pathogènes pour libérer du LPS bactérien, entraînant l'activation de la caspase-11 et l'assemblage de l'inflammasome non canonique NLRP3 [480–482]. Par ailleurs, les vésicules de la membrane externe (OMV) sécrétées par les bactéries à Gram négatif contenant du LPS peuvent également activer la caspase-11 suite à leur internalisation dans les cellules par endocytose médiée par la clathrine [483]. Ces OMV déclenchent l'activation de l'inflammasome dans différentes cellules, y compris les macrophages et des cellules épithéliales humaines et murines, ce qui montre une autre voie d'activation non canonique de l'inflammasome NLRP3 au cours des infections par les bactéries à Gram négatif.

3.3.2 L'inflammasome NLRP1

L'inflammasome humain NLRP1 (NALP1, *nacht leucine-rich repeat protein 1*, ou CARD7) a été identifié comme la première plate-forme d'activation de la caspase-1. Le NLRP1 humain a un domaine PYD en N-terminal, 3 domaines centraux : NBD, LRR et FIIND (*function-to-find domain*) et un domaine CARD en C-terminal [484]. Contrairement au génome humain qui possède un seul gène codant NLRP1, trois paralogues *Nlrp1*, nommés *Nlrp1a*, *b* et *c*, sont présents dans le génome de la souris. L'inflammasome NLRP1b murin a également été lié à la production d'IL-1 β suite à une interaction avec le muramyl-dipeptide (MDP) [485]. Des

études génétiques ont identifié *Nlrp1b* comme le gène responsable de la pathologie induite par la toxine létale (LT), sécrétée par *Bacillus anthracis* [486]. LT est un complexe protéique dimérique composé d'un antigène protecteur (PA), une toxine formant des pores, et d'un facteur létal, une protéase qui est délivrée par le PA dans le cytosol des cellules intoxiquées [487]. Des études ultérieures ont révélé que la susceptibilité à la mort cellulaire des macrophages induite par LT, un événement critique dans la pathogenèse de la pathologie induite par la LT, est médiée par l'activation de la caspase-1 dépendante de NLRP1b [486].

Des études sur les cellules THP1 ont montré que NLRP1 forme un complexe avec CARD8, ASC, les caspase-5 et -1 afin de favoriser la sécrétion d'IL-1 β [484]. D'autres études concernant NLRP1, ASC et pro-caspase-1 purifiés ont révélé que NLRP1 oligomériser avec la pro-caspase-1 en présence de MDP. Ces études ont suggéré que la caspase-1 est activée via un mécanisme en deux étapes par lequel le MDP induit un changement conformationnel de NLRP1 ce qui lui permet à son tour de se lier au nucléotide et de s'oligomériser, créant ainsi une plateforme pour l'activation de la caspase-1. Le mécanisme qui déclenche l'oligomérisation de NLRP1 reste incertain puisqu'il n'y a aucune preuve que le MDP se lie à NLRP1. De manière surprenante, la molécule adaptatrice ASC ne semble pas essentielle à l'activité de NLRP1, bien que son ajout augmente l'activation de la pro-caspase-1 médiée par NLRP1 in vitro [488].

3.3.3 L'inflammasome NLRP6

La protéine NLRP6, exprimée dans le tractus gastro-intestinal, les reins, le foie et les épithéliums, serait impliqué dans l'obésité, l'inflammation intestinale, la tumorigenèse, la régulation du microbiote commensal, et plus récemment, dans la reconnaissance des bactéries pathogènes [489–492].

Des souris déficientes en NLRP6 ont montré un microbiote intestinal altéré et une prédisposition à la colite avec une diminution des niveaux de sécrétion d'IL-18 par les cellules intestinales [489]. Cependant, Anand et al. ont montré que NLRP6 est un régulateur négatif de l'immunité innée durant certaines infections bactériennes (*L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* et *E. coli*). L'infection bactérienne des souris déficientes en NLRP6 entraîne une augmentation du nombre des monocytes et de neutrophiles dans le sang avec une activation de la voie de signalisation NF- κ B, montrant un rôle de NLRP6 dans la réponse inflammatoire [491]. Le mécanisme d'activation de NLRP6 dans ce processus reste cependant inconnu.

3.3.4 L'inflammasome NLRP7

NLRP7, exprimé chez l'homme, mais pas chez la souris, est activé en réponse aux lipopeptides bactériens (ligands TLR2) [493]. La structure en trois dimensions de NLRP7 a été étudiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et a révélé également un domaine PYD central, un pli à six faisceaux α -hélicoïdaux, autour d'un noyau hydrophobe [494]. Comme tous les membres de la famille NLRP, NLRP7 est composé d'un domaine N-terminal PYD, d'un domaine NACHT central suivi d'un domaine NAD et de plusieurs domaines LRR en C-terminal [495]. Plusieurs isoformes ont été décrites et prédites avec des nombres de LRR variables en raison de l'épissage alternatif. Le rôle du nombre de LRR dans la fonction de NLRP7 reste à élucider, cependant, l'analyse de deux isoformes de NLRP7 avec 5 et 7 LRR a révélé une activité pro-inflammatoire plus élevée de l'isoforme la plus longue, suggérant une conséquence fonctionnelle potentielle basée sur le nombre de LRR [493]. Différentes études contradictoires ont fourni des preuves d'un rôle de NLRP7 dans la régulation de l'inflammation, en particulier chez les macrophages. Alors que l'activation de l'inflammasome NLRP7 a été démontrée en réponse à une infection bactérienne chez les macrophages, son rôle anti-inflammatoire a été largement observé par surexpression dans des cellules non immunitaires. Par conséquent, l'élucidation du mécanisme précis nécessitera des études supplémentaires en raison des activités contradictoires rapportées pour l'activation de l'inflammasome et/ou la régulation de NF- κ B [495].

Par ailleurs, il existe de plus en plus de preuves que NLRP7 joue un rôle important au début de la grossesse en affectant la maturation des ovocytes, le remodelage de l'endomètre et le développement placentaire. De plus, des mutations incluant des substitutions, des insertions, des délétions et des duplications, qui affectent la plupart des exons NLRP7 et modifient directement NLRP7 ont été détectées chez des femmes ayant des antécédents de mole hydatiforme récurrent [496,497], une forme de grossesse anormale caractérisée par un néoplasie trophoblastique qui entraîne un développement embryonnaire défectueux. Alors que le lien entre les variants génomiques NLRP7 et mole hydatiforme semble évident, le mécanisme moléculaire et les conséquences fonctionnelles de ces mutations sont encore mal compris. Une hypothèse émergente est que l'inflammation peut contribuer à la pathogenèse de la mole hydatiforme, car les tissus placentaires des patientes atteintes présentent des caractéristiques histopathologiques de chorioamnionite (inflammation des membranes fœtales) et de

chorangiose (hypoxémie tissulaire entraînant une néoangiogenèse et une nécrose chorioniques excessives) [495].

3.3.5 L'inflammasome AIM2

AIM2 est un récepteur cytosolique qui détecte l'ADN double brin (ADNdb) d'origine microbienne et virale, pour former un inflammasome et activer la caspase-1 [498–501] (Figure 17B). Ce récepteur est constitué d'un domaine pyrine en N-terminal et d'un domaine HIN200 de liaison à l'ADN en C-terminal. C'est la seule protéine connue qui contient le domaine HIN200, lequel pourrait entraîner la maturation et la libération des IL-1 β et IL-18 via une interaction avec ASC et la caspase-1 [500–502].

Le domaine HIN-200 chargé positivement exerce une attraction électrostatique sur le squelette sucre-phosphate chargé négativement de l'ADNdb et se lie à cet ADNdb dans les cellules murines et humaines, à condition que cet ADNdb ait une longueur d'au moins 70 pb. Par conséquent, l'assemblage de l'inflammasome AIM2 est largement contrôlé par la longueur de l'ADNdb [500,501,503–505].

Les macrophages murins KO en AIM2 sont déficitaires en caspase-1, pro-IL1 β et pro-IL-18 après une infection par *Listeria monocytogenes* et par la souche *Francisella tularensis* LVS, montrant ainsi l'importance de l'activation de l'inflammasome AIM2 contre les bactéries au niveau intracellulaire [502,506]. De plus, AIM2 joue un rôle majeur dans la détection de virus à ADN cytosoliques tels que le cytomégalo virus murin (MCMV). Après une infection par le MCMV, l'IL-18 et la sécrétion d'IFN γ ont été diminuées chez des souris déficientes en AIM2 [502].

3.3.6 L'inflammasome Pyrine

La pyrine est codée par le gène humain *MEFV* (*familial mediterranean fever gene*), dont les mutations sont associées à des affections auto-inflammatoires connues sous le nom de fièvre méditerranéenne familiale (FMF) [507]. Des souris porteuses des mutations associées à la FMF ne développent pas de manifestations de la maladie lorsqu'elles présentent une délétion sur le gène codant la GSDMD, suggérant que la pyroptose et la libération des cytokines sont associées à la GSDMD, laquelle pourrait jouer un rôle central dans les manifestations de la maladie [508]. La pyrine humaine possède quatre domaines fonctionnels : le domaine pyrine (PYD), un domaine à « zinc finger » (bBox), un domaine enroulé (CC) et un domaine B30.2/SPRY [509].

La pyrine de souris ne possède pas de domaine B30.2/SPRY. La pyrine est assez distincte parmi les récepteurs formant l'inflammasome et ne partage que le domaine PYD avec NLRP1, NLRP3 et AIM2. Le domaine PYD des récepteurs formant l'inflammasome est important pour l'interaction avec la protéine adaptatrice ASC, qui lors du recrutement au récepteur oligomérisent en filaments à travers son PYD et recrute la pro-caspase-1 dans le complexe via son domaine CARD.

La pyrine est constitutivement inactivée et son activation requiert l'inactivation de ses inhibiteurs endogènes. Ainsi, en homéostasie, les GTPases RhoA facilitent le recrutement des protéines kinases de sérine-thréonine PKN1 et PKN2, qui se lient et phosphorylent la pyrine en S208 et S242 chez l'homme. Ces résidus phosphorylés se lient ensuite aux protéines inhibitrices 14-3-3 (famille de protéines de liaison à la phosphosérine qui régulent la fonction de nombreuses protéines de signalisation), inhibant ainsi l'activation de la pyrine [509,510]. Les protéines Rho-modificatrices, telles que la glycosyltransférase de TcdB de *C. difficile*, l'adénylyltransférase VopS du *Vibrio parahaemolyticus*, la protéine GTPase YopE et la cystéine protéase YopT de *Yersinia pestis*, induisent l'activation de la caspase-1 et la libération d'IL-1 β et d'IL-18 dans les macrophages murins et humains par le biais de l'activation de la pyrine [391,511,512]. L'inactivation de RhoA par ces toxines bactériennes entraîne la déphosphorylation de la pyrine et la dissociation des protéines 14-3-3, favorisant l'activation de la pyrine murine et humaine [513]. En effet, des mutations des sérines, telles que S242R, perturbent la phosphorylation inhibitrice, conduisant à l'activation constitutive de la pyrine [514]. La dynamique du cytosquelette a également été impliquée dans l'activation de la pyrine, puisque la pyrine est colocalisée avec les microtubules suggérant que la formation de l'inflammasome de pyrine pourrait être régulé par d'autres processus que la déphosphorylation [515]. En effet, l'inhibition de l'activation de la pyrine par des médicaments perturbant les microtubules tels que la colchicine empêche la polymérisation des ASC médiée par la pyrine dans les BMDM murins et les PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) humains [513,516]. Il est à noter que certaines mutations trouvées chez les patients atteints de FMF se sont révélées capables d'activer la pyrine indépendamment des microtubules, suggérant que la régulation de l'inflammasome à pyrine est plus complexe qu'on ne le pensait auparavant, et que d'autres mécanismes peuvent jouer un rôle dans son activation [516].

3.3.7 L'inflammasome NAIP

Les protéines NAIP inhibitrices de l'apoptose de la famille NLR (*NOD-like receptor family apoptosis inhibitory protein*) sont des récepteurs cytosoliques appartiennent à la famille IAP (*inhibitor of apoptosis*) et sont caractérisées par la présence en N-terminal de trois domaines BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) et un domaine conservé de liaison aux nucléotides (NBD), un domaine hélicoïdal 1 (HD1, *helix domain 1*), un domaine hélicoïdal « ailé » (WHD, *winged helix domain*), un domaine hélicoïdal 2 (HD2, *helix domain 2*), et un domaine de répétition riche en leucine (LRR [517]). Les NAIP reconnaissent certains composants des bactéries à Gram négatif, notamment les composants du T3SS (système de sécrétion de type III) et des flagelles bactériens [518,519]. Les protéines NAIP et le NLRC4 sont homologues, ne différant que dans leur domaine respectif BIR et CARD, et, après activation, peuvent s'assembler en un inflammasome actif pour induire le clivage de l'IL-1 β et l'IL-18 par la caspase-1, ainsi que la pyroptose. Cependant, leur rôle dans la régulation de l'apoptose n'est pas encore clair [520–522].

Les NAIP sont principalement exprimés dans les cellules immunitaires innées et le côlon. Les souris dépourvues de NAIP présentent une pathologie tissulaire retardée par rapport à leurs homologues du groupe témoin lorsqu'elles sont exposées au DSS [523]. Les NAIP se sont révélés essentiels dans la restriction des agents pathogènes, car, en effet, les souris déficientes en NAIP infectées par *S. Typhimurium* présentaient une charge bactérienne élevée par rapport aux souris hétérozygotes ou aux souris témoins [524]. En outre, le tissu tumoral isolé à partir de souris déficientes en NAIP exprimaient des cytokines pro-inflammatoires et des métalloprotéinases matricielles (MMP) liées à la croissance et à l'invasion tumorales, avec une activation importante du transducteur de signal et de l'activateur de la transcription 3 (STAT3). Cependant, aucune différence dans les taux d'IL-18 et d'IL-1 β n'a été détectée pendant la colite induite par le DSS. Il a donc été montré que les NAIP régulent la phosphorylation de STAT3 indépendamment de l'axe de l'inflammasome [523].

Le génome de la souris code sept protéines NAIP, la spécificité du ligand étant conférée par un site de liaison au ligand dans leur domaine NBD [517,525]. NAIP1 et NAIP2 reconnaissent respectivement les composants protéiques aiguille et bâtonnet de la « seringue » du T3SS bactérien, , tandis que NAIP5 et NAIP6 reconnaissent la flagelline [526–528]. Cependant, les ligands de NAIP3, 4 et 7 sont actuellement inconnus. Le facteur de régulation

de l'interféron 8 (IRF8) régit partiellement la transcription des gènes codant les NAIP chez la souris [529]. Contrairement au génome de la souris, le génome humain code un seul NAIP avec deux isoformes fonctionnelles qui reconnaissent la flagelline et les protéines du T3SS ; cependant, les mécanismes par lesquels ces isoformes assurent la spécificité du ligand ne sont pas clairs [527,530].

3.3.8 L'inflammasome NLRC4

La protéine NLRC4 a été initialement décrite par Poyet et al. comme étant une protéine pro-apoptotique [531]. En cherchant des homologues structuraux d'APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*), une protéine connue pour activer les caspases apoptotiques en réponse au cytochrome cytosolique et contenant un domaine d'activation et de recrutement de caspases (CARD) et un domaine de liaison à l'ATP, les chercheurs ont identifié une protéine capable d'activer la caspase-1 et l'ont nommée IPAF (*ICE-protease-activating factor*) [531].

La découverte initiale de l'IPAF s'est accompagnée de l'observation que la protéine entière était incapable d'activer la caspase-1 dans des cellules transfectées, tandis que l'expression de versions tronquées de la protéine dépourvue du domaine de répétitions riches en leucine (LRR) en C-terminal induisait l'activation de la caspase-1 [532]. Cela a mis en évidence que l'activation de l'IPAF et d'autres protéines activant l'inflammasome est étroitement régulée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels, afin d'empêcher une signalisation pro-inflammatoire incontrôlée par l'inflammasome. L'expression de NLRC4 est régulée à la hausse par des stimuli pro-inflammatoires tels que le TNF α , ainsi que par l'activation de p53 médiée par un stress génotoxique [533]. IPAF a été renommée NLRC4 du fait de sa structure possédant notamment un domaine CARD en N-terminal, et ainsi reclassée au sein la famille des NLR. Conformément à son rôle dans la détection du danger, de nombreuses études ont démontré que les niveaux basaux d'expression de NLRC4 sont suffisants pour assurer l'activation de l'inflammasome NLRC4 dans les cellules épithéliales et immunitaires. Après une exposition à *S. typhimurium*, des macrophages murins dépourvus de NLRC4 n'ont montré aucune activation de la caspase-1, suggérant que l'activation de NLRC4 était probablement régulée par un ligand [534].

Miao et al. (2006) et Franchi et al. (2006) ont démontré que la flagelline intracytoplasmique de *Salmonella* était capable d'induire l'activation de la caspase-1 médiée par

NLRC4 [535]. Le domaine LRR de NLRC4 agissait comme un récepteur direct de la flagelline, comme cela avait été démontré pour le domaine LRR de TLR5. Miao et al. (2010) ont ensuite démontré que les composants du système de sécrétion de type III (T3SS) de *Salmonella* pouvaient également induire une activation de la caspase-1 dépendante de NLRC4 en l'absence de flagelline, ce qui suggère que l'activation de NLRC4 par des ligands bactériens pourrait être plus complexe [527,536]. De plus, Kofoed et Vance (2011) et Rayamajhi et al. (2013) ont presque simultanément montré que NAIP5 et NAIP2 murins formaient des complexes avec NLRC4 via une interaction, soit respectivement avec la flagelline, soit avec la protéine aiguille du T3SS de *Salmonella* [526,537]. Des études supplémentaires ont révélé que NAIP6 pouvait se substituer à NAIP5 dans la reconnaissance de la flagelline et que NAIP1 montrait une capacité similaire à induire l'activation de l'inflammasome NLRC4 en réponse à la protéine aiguille du T3SS [538,539]. Ainsi, différents gènes de NAIP murins codent des protéines capables d'induire une activation spécifique de NLRC4 médiée par un certain nombre de ligands bactériens. Cependant, l'homme ne possède pas la duplication du gène NAIP observée chez la souris. NAIP humain provoque l'activation de NLRC4 médiée par la protéine aiguille du T3SS ainsi que par la flagelline dans les cellules humaines [540].

3.3.8.1 Caractéristiques structurelles de NLRC4

Comme tous les membres de la famille NLR, NLRC4 partage une structure commune à trois domaines principaux : un domaine d'interaction homotypique en N-terminal, un domaine central de liaison aux nucléotides et une série de LRR C-terminaux. Le domaine d'interaction homotypique CARD de NLRC4 est constitué des 94 premiers acides aminés de la protéine, présentant un repliement typiquement en 6 hélices α antiparallèles emballées autour d'un noyau hydrophobe [541]. Le domaine central de liaison aux nucléotides appartient à la superfamille des ATPases AAA+ et partage des caractéristiques structurelles avec d'autres protéines NLR, notamment un domaine central NTPase et deux domaines hélicoïdaux (HD1 et HD2) qui sont interrompus par une région appelée domaine hélicoïdal ailé (WD). Les 440 acides aminés C-terminaux de NLRC4 sont constitués de 15 unités structurelles répétées, chacune étant un brin bêta riche en leucine lié à une courte hélice alpha de 8 à 15 acides aminés, appelées répétitions riches en leucine [542].

L'analyse cristallographique aux rayons X de la protéine NLRC4 recombinante murine dépourvue du domaine CARD en N-terminal a révélé que cette protéine présente des interactions intramoléculaires importantes entre le domaine LRR en C-terminal et le domaine

de liaison aux nucléotides. La structure monomère est stabilisée par ces interactions ainsi que par les interactions avec l'ADP occupant le site de liaison des nucléotides [541]. Une mutation d'un résidu à proximité de l'ADP, entraîne l'oligomérisation spontanée de NLRC4, et l'activation de l'inflammasome. De même, la mutation de la lysine du NBD empêche NLRC4 de se lier à l'ATP, ce qui inhibe l'activation de la caspase-1 [543] (Figure 18).

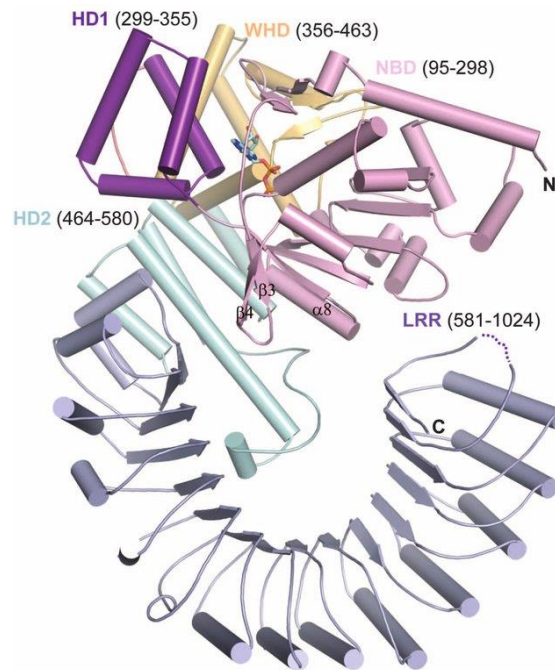


Figure 18. Structure globale de mNLRC4. Les domaines structuraux de mNLRC4DCARD sont étiquetés, et les numéros suivant leurs étiquettes indiquent leurs limites. La molécule d'ADP liée est représentée en bâton et en cyan. Certains des éléments structuraux sont étiquetés. La ligne pointillée indique la région désordonnée (résidus 1011 à 1014). "N" et "C" représentent l'extrémité N et l'extrémité C, respectivement [541].

3.3.8.2 L'activation de l'inflammasome NAIP/NLRC4

Les études initiales sur NLRC4 ont révélé des interactions hétérotypiques avec plusieurs protéines de la famille NLR (NOD1, NOD2, NLRP3 et NAIP) [540]. Des travaux structuraux ultérieurs ont suggéré que la liaison du ligand modifie la structure des protéines NAIP de sorte qu'elles puissent interagir avec NLRC4 et induire son oligomérisation. Néanmoins, NLRC4 peut avoir des interactions hétérotypiques avec d'autres protéines NLR, via un mécanisme structural similaire. La microscopie à super-résolution a montré que NLRC4 et NLRP3 colocalisent dans l'inflammasome dans les cellules infectées, bien que ces études n'aient pas la résolution nécessaire pour démontrer des interactions directes protéine-protéine entre NLRC4 et NLRP3 [544,545]. A ce jour, il n'a toujours pas été établi que la formation de structures hétéro-oligomériques avec d'autres protéines NLR soit une caractéristique commune à la

signalisation NLR, ni que la capacité de NLRC4 à répondre au NAIP lié à un ligand bactérien représente un mécanisme de signalisation NLR unique à NLRC4 [546].

Deux études concernant la liaison de NLRC4 avec NAIP2 et l'aiguille du T3SS ont révélé que NAIP lié au ligand s'associait à NLRC4 et semblait former des structures en forme de disque constituées de monomères ouverts de NLRC4 [519,547]. Les monomères de NLRC4 de ce disque établissent des contacts intermoléculaires importants avec les faces opposées des molécules de NLRC4 voisines [519,547]. Ces études ont démontré qu'un seul NAIP était présent dans ces structures oligomériques qui, par ailleurs, présentaient une symétrie 11 fois plus grande, ce qui suggère qu'un seul NAIP pourrait initier l'assemblage de 10 molécules de NLRC4 en un inflammasome en forme de roue. Une étude basée sur la cryo-EM (cryo-microscopie électronique) sur les complexes NLRC4/NAIP5 et la flagelline de *S. Typhimurium* dans des cellules HEK293 a révélé des structures formées par des oligomères de NLRC4 en forme de bâtonnets constitués de monomères disposés en hélice plutôt que de disques fermés [548]. Cependant, on ne sait pas si NLRC4 peut former l'un ou l'autre complexe lorsqu'il est activé et si la différence dans la structure oligomérique est fonction du complexe ligand activateur-protéine NAIP [548].

A noter que l'activation de la caspase-1 par NLRC4 est indépendante du TLR5, car elle se poursuit dans les macrophages déficients en TLR5 [535,549]. Ces résultats indiquent que la flagelline est reconnue par au moins deux récepteurs différents : TLR5 détecte la flagelline extracellulaire via le domaine N-terminal de la flagelline, tandis que NLRC4 reconnaît la flagelline cytosolique [550]. Des preuves indiquent que la protéine NAIP5 est également importante pour la reconnaissance de la partie carboxy-terminale de la flagelline de *L. pneumophila* et contribue à l'activation de l'inflammasome NLRC4 [528].

L'activation de l'inflammasome NLRC4 est principalement régulée au niveau post-transcriptionnel. Les deux mécanismes de régulation les mieux décrits sont la liaison au ligand et la phosphorylation [548] (Figure 19).

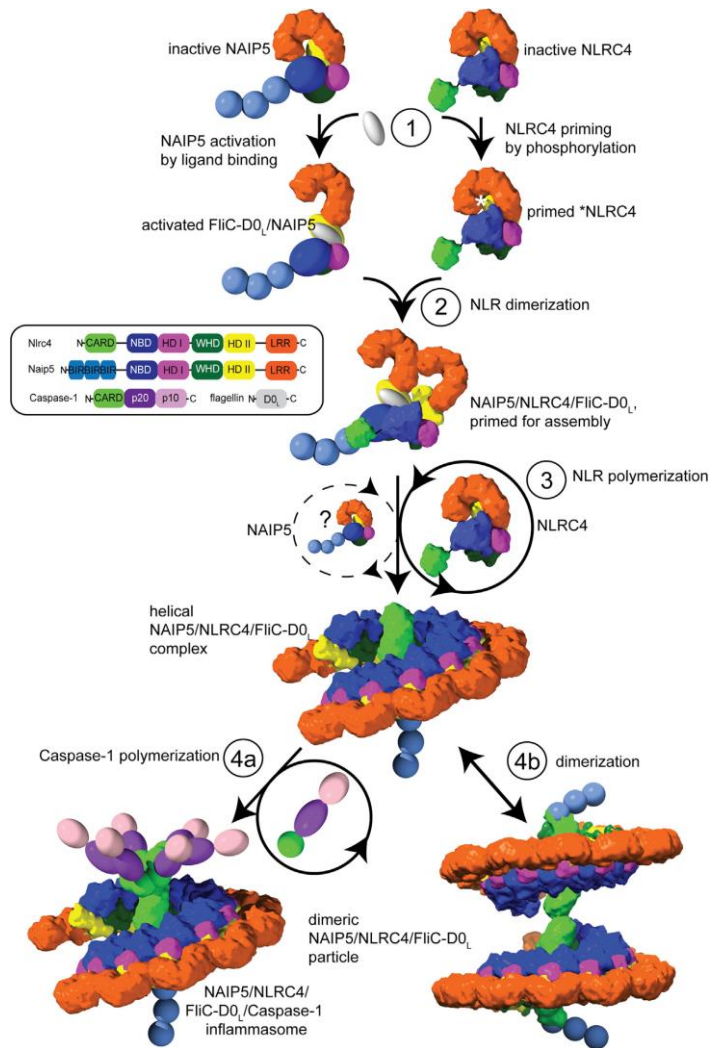


Figure 19. Modèle d'activation de l'inflammasome NAIP5/NLRC4. Étape 1 : La flagelline (oval blanc) amorce NLRC4 en induisant une phosphorylation, puis se lie à NAIP5 et l'active. L'étoile blanche indique le site de phosphorylation dans NLRC4. **Étape 2 :** NAIP5 activé recrute et active NLRC4 amorcé en induisant des réarrangements conformationnels similaires pour former le complexe NAIP5/NLRC4/ FliC-D0_L. **Étape 3 :** Ce complexe forme un site de nucléation pour la polymérisation hélicoïdale de NLRC4. NAIP5 activé peut également être incorporé à basse fréquence. **Étape 4a :** le côté exposant CARD (vert) forme un complexe de nucléation pour la multimérisation de la caspase-1. **Étape 4b :** le côté exposant CARD du complexe hélicoïdal permet également la dimérisation. Dans les complexes hélicoïdaux, 11 molécules NAIP5/NLRC4 sont représentées [548].

L'activation de NLRC4 implique des modifications post-traductionnelles, en particulier la phosphorylation et éventuellement l'ubiquitination. En réponse à une exposition à *Salmonella*, la protéine NLRC4 murine exprimée dans les macrophages était phosphorylée sur la sérine 533 (S533). En outre, un mutant de NLRC4 incapable d'être phosphorylé sur ce site a été exprimé dans des macrophages dépourvus de NLRC4 de type sauvage (*Nlrc4*^{-/-}), et a présenté une activation de la caspase-1 et une sécrétion d'IL-1 β atténuées après une infection par *Salmonella*. L'isoforme δ de la protéine kinase C (PKC δ) phosphorylait NLRC4 *in vitro* et l'administration d'inhibiteurs et la déplétion génétique de PKC δ inhibaient la signalisation de

l'inflammasome NLRC4 [546]. Une autre kinase, la *Leucine Rich Repeat-containing Kinase-2* (LRRK2), qui s'associe également à NLRC4, est capable de le phosphoryler au niveau du résidu S533 [551]. De la même manière que pour PKC δ , la réduction génétique de l'expression de LRRK2 a également entraîné une diminution de l'activation de l'inflammasome NLRC4. Des études cristallographiques aux rayons X ont révélé que le résidu S533 était phosphorylé dans la protéine NLRC4 recombinante purifiée exprimée dans des cellules d'insecte. Cette protéine a été cristallisée dans son état monomérique inactif et la phosphorylation de ce résidu sérine semblait stabiliser les interactions au sein de la molécule inactive [550].

L'activation de la pro-caspase-1 est induite par NLRC4 dans les cellules en présence de l'adaptateur ASC. Comme indiqué plus haut, ASC contient un domaine pyrine et un domaine CARD. L'activation de l'inflammasome provoque la condensation d'ASC cytoplasmique en un oligomère insoluble connu sous le nom de « tache apoptotique » [552]. *In vitro*, l'assemblage de d'ASC adopte la forme de hélices homopolymériques [553]. Cela permet de rapprocher les domaines CARD d'ASC et conduit à la polymérisation des domaines CARD de la pro-caspase-1, entraînant l'activation de nombreuses molécules de pro-caspase-1 (Figure 17). La protéine NLRC4 activée s'associe également à ASC et colocalise avec celle-ci après activation par *Salmonella* [545,554]. Ces résultats sont cohérents avec la capacité d'ASC à renforcer l'activation de la pro-caspase-1 induite par NLRC4.

Toutes ces interactions contribuent à former le complexe multiprotéique appelé inflammasome NLRC4, constitué de NAIP, NLRC4, ASC, et pro-caspase-1. La formation de ce complexe contribue à l'activation de la caspase-1.

3.3.8.3 Les conséquences de l'activation de l'inflammasome NLRC4

Après la formation du complexe multiprotéique formé par NAIP, NLRC4, ASC et la pro-caspase-1, l'activation de la caspase-1 entraîne une cascade exponentielle de recrutement de caspase-1, contribuant à la libération des 2 sous-unités p10 et p20 de cette caspase, à un clivage de la Gasdermine D, ainsi qu'à la maturation et au relargage des cytokines pro-inflammatoires [531,555]. La caspase-1 est également connue pour effectuer une maturation protéolytique similaire de l'IL-18 [556–558]. Cependant, la caspase-1 a d'autres cibles intracellulaires qui peuvent réguler la fonction cellulaire. Elle peut induire le clivage protéolytique du facteur de transcription SREBP1 (sterol response element binding protein-1), ce qui entraîne une modification du métabolisme des stérols dans les cellules cibles [559]. Suite à la formation de l'inflammasome, la pro-caspase-1 liée à ASC activée se clive d'une manière

autoprotéolytique, contribuant à la libération des 2 sous-unités p20 et p10 [560]. Ces 2 sous-unités contribuent à l'activation de l'IL-33 et à la maturation des cytokines spécifiques des inflammasomes pro-IL1 β , et pro-IL-18 ; elles clivent le prodomaine de la pro-IL-1 β inactive au niveau de YVHD (119)-A, produisant ainsi de l'IL-1 β , et clivent la pro-IL-18 murine à LESD (35)-N pour générer de l'IL-18 bioactive [431,561,562].

De plus, la caspase-1 active également de manière protéolytique la protéine cytosolique connue sous le nom de Gasdermin-D et le fragment amino-terminal résultant de ce clivage s'assemble ensuite en pores membranaires cytoplasmiques [439]. Il est maintenant connu que l'activation de la Gasdermine induit une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire et induit finalement le processus de mort cellulaire connu sous le nom de pyroptose. Contrairement à l'apoptose (mort cellulaire programmée classique), la pyroptose entraîne le relargage de composants intracellulaires pro-inflammatoires, comme la protéine HMGB1, qui provoquent également d'autres signaux inflammatoires dans les cellules hôtes voisines, comme le relargage de cytokines activées par les macrophages. La pyroptose contribue également à la défense de l'hôte en perturbant l'environnement intracellulaire des pathogènes qui activent NLRC4 [431,563]. De plus, NLRC4 recrute la pro-caspase-8 dans le complexe de l'inflammasome. Le recrutement et l'activation de la pro-caspase-8 en réponse à une infection par *Salmonella* nécessitent à la fois la présence de NLRC4 et d'ASC. L'activation de la caspase-8 peut se substituer à la caspase-1 dans la maturation de pro-IL-1 β , cependant, contrairement à la caspase-1, la caspase-8 est une caspase pro-apoptotique [554]. Dans les cellules dépourvues de la caspase-1 ou de la Gasdermine, empêchant la pyroptose, l'activation de NLRC4 induite par *Salmonella* entraînera une apoptose dépendante de la caspase-8 [564].

3.3.8.4 Activation de l'inflammasome NLRC4 par T3SS ou les flagelles bactériens

L'activation de l'inflammasome NAIP5/NLRC4 en réponse à la protéine aiguille du T3SS de *S. Typhimurium* induit l'activation de la pro-caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β par l'intermédiaire de NLRC4 dans les macrophages intestinaux [565]. De plus, des homologues de cette aiguille du T3SS provenant d'autres pathogènes entériques, notamment *S. flexneri* (MxiH), *E. coli* entérohémorragique (EprI) et *P. aeruginosa*, ainsi qu'un système de sécrétion système de sécrétion de type IV (T4SS) comme celui de *L. pneumophila*, activent également NAIP1/NLRC4 [539,549,566]. Il est intéressant de noter que les ligands provenant d'organismes commensaux, comme la flagelline d'*E. coli* non pathogène, activent légèrement NLRC4 par rapport à la flagelline de *Salmonella* [567]. Par ailleurs, le T3SS de *S. Typhimurium*

favorise la translocation de la flagelline dans le cytosol du macrophage. Cependant, il est également possible que le T3SS crée un organite qui permet le transport de la flagelline dans le cytosol de l'hôte, peut-être par un appareil endogène de transport de peptides de l'hôte [568]. Des souris dépourvues de NLRC4 (*Nlrc4*^{-/-}) étaient plus sensibles à la provocation orogastrique par *Salmonella*, avec une survie réduite et une charge bactérienne systémique accrue [565,569]. L'ensemble de ces études suggère que l'inflammasome NLRC4 joue un rôle important dans l'inflammation à la suite d'une reconnaissance des agents pathogènes bactériens. Bien que de nombreuses études initiales se soient concentrées sur la reconnaissance des *Salmonella* intracellulaires par les macrophages ou les cellules phagocytaires, des études récentes ont démontré que de multiples mécanismes de défense initiés par NLRC4 dans les cellules épithéliales et immunitaires sont responsables de la restriction des *Salmonella* et probablement d'autres agents pathogènes entériques. La plupart des études étaient concentrées sur la capacité de NLRC4 à entraîner la sécrétion d'IL-1 β , mais récemment des études ont montré la capacité de NLRC4 à entraîner la sécrétion des IL-18 et des IL-33 [431,569,570].

L'activation de la caspase-1 par l'intermédiaire de NLRC4 est indépendante du TLR5, cette activation se poursuit sans interruption dans les macrophages déficients en TLR5 [534,535,549]. Ces résultats indiquent que la flagelline est reconnue au moins par deux récepteurs différents : TLR5 détecte la flagelline extracellulaire, tandis que NLRC4 reconnaît la flagelline au niveau cytosolique. Des études prouvent que la protéine NAIP5 est également importante pour la reconnaissance de la partie C-terminale de la flagelline de *L. pneumophila* et contribue à l'activation de l'inflammasome NLRC4 [528]. Il a été proposé que NAIP5 s'associe à NLRC4 pour former un complexe inflammasome en réponse à *L. pneumophila* [571]. En revanche, une étude montre que l'activation de la caspase-1 induite par une infection par *S. Typhimurium* ou *P. aeruginosa*, qui est également déclenchée par la flagelline cytosolique, est NAIP5 indépendante [528]. Étant donné que les polymorphismes de NAIP5 peuvent influencer la susceptibilité à *L. pneumophila* indépendamment de l'activation de la caspase-1, il serait important d'étudier si NAIP5 a une fonction supplémentaire indépendante de NLRC4 dans l'inhibition de la croissance de *L. pneumophila* dans les macrophages [572]. Un ensemble d'études démontre que l'inflammasome NAIP-NLRC4 joue un rôle important dans le contrôle de l'infection entérique par des agents pathogènes bactériens, à la fois dans l'épithélium et dans les compartiments immunitaires. Norlander et al. (2014) ont montré que la reconstitution de souris *Nlrc4*^{-/-} avec de la moelle osseuse de type sauvage ne permettait pas de rétablir le contrôle de l'infection par *Citrobacter rodentium* [573]. Sellin et al. (2014), ont

démontré que la délétion tissulaire spécifique de NAIP1-6 dans l'épithélium intestinal de la souris entraînait une augmentation de la charge bactérienne de *Salmonella* au début de l'infection. Plus précisément, l'élimination ou la clairance des entérocytes infectés par *Salmonella* dans la lumière intestinale était dépendante de l'expression intestinale des protéines NAIP [524]. Comme pour les macrophages péritonéaux, la clairance des entérocytes médiée par NLRC4 s'est accompagnée d'une production d'eicosanoïdes. De façon remarquable, la mort et la clairance des entérocytes ne nécessitaient pas entièrement la présence de la caspase-1, ce qui démontre qu'un programme de mort cellulaire induit par NLRC4 et médié par la caspase-8 contribue également à la clairance des entérocytes infectés par des pathogènes [574].

Il existe également des voies indépendantes de la flagelline activant l'inflammasome NLRC4 après une infection par certaines bactéries. Par exemple, *M. tuberculosis*, une bactérie intracellulaire non flagellée, active la caspase-1 par l'intermédiaire de NLRC4 et inhibe l'activation de l'inflammasome en produisant Zmp1, une métalloprotéase de zinc, par un mécanisme qui reste mal compris [575]. Comme de nombreux PAMPs peuvent être reconnus par le même TLR, il est probable que d'autres molécules microbiennes distinctes de la flagelline puissent également induire l'activation de NLRC4. Il a également été rapporté que *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* peuvent activer la caspase-1 par une voie NLRC4-dépendante mais indépendante de la flagelline [566,576]. *L. monocytogenes* active de multiples inflammasomes dans les macrophages, dont NLRC4 [577]. Des agents pathogènes pulmonaires comme *Burkholderia pseudomallei* peuvent déclencher à la fois les inflammasomes NLRC4 et NLRP3 qui seront nécessaires pour une protection complète contre ce type d'infections [578]. Ces pathogènes non entériques déclenchent néanmoins NLRC4 par des mécanismes similaires à ceux des pathogènes entériques classiques activant NLRC4 comme *Salmonella* et *Shigella* : par la détection de la flagelline ou de composants du T3SS bactérien par les protéines NAIP. Cependant, certaines bactéries, notamment l'agent pathogène intracellulaire *Anaplasma phagocytophilum*, peuvent induire l'activation de la protéine NLRC4 des macrophages sans activation de NAIP, par un mécanisme dépendant de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) en médiant la synthèse des prostaglandines [547,579].

Jorgensen et al. ont montré que l'activation des inflammasomes dans les macrophages infectés induisait une activation d'une voie de signalisation dépendante de la caspase-1 et indépendante des pièges intracellulaires associés à la pyroptose (PIT, *pore-induced intracellulair traps*) contribuant à la sécrétion des IL-1 β et IL-18. Les PIT étaient constitués de macrophages gonflés, dont les membranes cellulaires et nucléaires étaient rompues et dans

lesquels des bactéries intracellulaires étaient piégées. Ces PIT étaient facilement absorbés par les neutrophiles activés, et les bactéries piégées étaient ensuite éliminées par l'activité de la NADPH-oxydase des neutrophiles. Ce mécanisme pourrait être essentiel à l'élimination des bactéries intracellulaires capables d'activer l'inflammasome NLRC4 [563].

Il est établi que NLRC4 est exprimé et actif dans les macrophages et les épithéliums et notamment dans les cellules épithéliales intestinales. Cependant, son expression et son rôle dans les neutrophiles sont controversés. Dans certaines infections intracellulaires (comme l'infection à *Burkholderia*) ou dans des tissus à immunité restreinte (comme la cornée), les agents pathogènes sont capables de stimuler la production des neutrophiles et d'IL-1 β indépendamment de NLRC4 [578,580]. En revanche, Chen et al. ont montré une fonction spécifique de NLRC4 des neutrophiles dans la production prolongée d'IL-1 β , en l'absence de mort cellulaire des neutrophiles, lors d'une infection par *Salmonella* [581].

3.4 Les effecteurs des inflammasomes

3.4.1 La protéine adaptatrice ASC

Masumoto et al. [552] ont décrit en 1999 une protéine de 22 kDa contenant un domaine de recrutement des caspases (CARD) en position C-terminale et capable de former un agrégat pendant l'apoptose dans la lignée cellulaire HL-60 de leucémie promyélocytaire humaine. Compte tenu de ce premier rapport, la protéine a été nommée ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruit domain). En 2001, la même équipe a démontré que ASC possède deux domaines, un domaine Pyrine (PYD) en N-terminal et un domaine CARD en C-terminal, et est exprimé par les cellules épithéliales des muqueuses et leucocytaires, notamment par les monocytes CD14+ [582]. ASC est également connue sous le nom de TMS1 (*target of methylation-induced silencing-1*), connu comme étant inactivé dans environ 40 % des cancers du sein [583].

ASC fonctionne comme une protéine adaptatrice centrale pour la formation des inflammasomes, étant recrutée lors de l'activation de plusieurs récepteurs cytosoliques de la famille NLR (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRC5, NAIP2, NAIP5/ NLRC4, NAIP6), de HIN et de AIM2. Les domaines PYD et CARD d'ASC, couramment retrouvés dans les protéines impliquées dans l'immunité innée, sont impliqués dans les interactions protéine-protéine homodimériques pour la formation de complexes oligomériques multiprotéiques entre les domaines PYR et CARD respectifs. Ces interactions facilitent la polymérisation d'ASC pour

former de longs filaments hélicoïdaux qui sont condensés en un agrégat macromoléculaire intracellulaire, appelé « ASC speck » [584]. Ce complexe induit ensuite l'activation par proximité du zymogène pro-caspase-1 en caspase active qui clive les formes inactives des pro-IL-1 β , et pro-IL-18 en cytokines pro-inflammatoires bioactives [585].

3.4.2 Les caspases

La caspase-1 a été décrite pour la première fois en 1989 comme étant la cystéine protéase responsable de la production d'IL-1 β dans les monocytes, d'où son nom original d'enzyme de conversion de l'IL-1 β (ICE) [586,587]. En 1996, une nomenclature unifiée a été introduite pour ces enzymes de conversion, qui intègre le nom "caspase", où le 'c' indique un mécanisme de protéase à cystéine et 'aspase' se rapporte à leur capacité de clivage après l'acide aspartique, propriété catalytique la plus distinctive de cette famille [588].

Les caspases sont exprimées dans les cellules immunitaires et non immunitaires et la majorité d'entre elles sont exprimées de manière constitutive à l'état d'homéostasie. Les caspases sont produites sous forme de zymogènes, enzymatiquement inactifs, appelés pro-caspases, qui subissent une dimérisation ou une oligomérisation pour être activés [430,588]. Le domaine effecteur de la protéase des pro-caspases (domaine caspase) est clivé en grandes et petites sous-unités au cours du processus d'activation, formant ensuite des complexes pour l'activité enzymatique [589,590]. Les caspases sont classées en fonction de leur rôle, démontré ou supposé, dans l'apoptose (caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10) et la signalisation inflammatoire (caspases-1, -4, -5, -11 et -12). La caspase-14 est généralement positionnée en dehors de ces groupes apoptotique et inflammatoire car qu'elle est uniquement impliquée dans la différenciation terminale des kératinocytes [591–593]. Elles contiennent un domaine C-terminal, qui transforme protéolytiquement la protéine cible et qui contient un domaine amino-terminal de taille variable, suivi séquentiellement de grandes et petites sous-unités catalytiques, respectivement d'environ 20 kDa et 10 kDa, formant ensemble le domaine protéase (indiqués en jaune et rose dans la figure 20). Les régions amino-terminales des caspases contiennent, soit un domaine de recrutement des caspases (CARD ; caspases-1, -2, -4, -5, -9, -11), soit un domaine effecteur de mort (DED, *death effector domain* ; caspases -8, -10) qui favorisent leur recrutement et leur activation dans des complexes multiprotéiques [594]. Les domaines DED et CARD appartiennent à la superfamille de domaines de mort (DD, *death domain*) et sont connus pour faciliter l'assemblage de grands complexes de signalisation oligomériques par

auto-association (interactions homotypiques) et les interactions protéine-protéine avec des protéines contenant DED/CARD. L'oligomérisation dépendante de DED/CARD peut déclencher une activation dépendante des caspases de proximité ou activer des fonctions indépendantes des caspases (19, 20). L'inactivation de l'activité enzymatique de certaines de ces caspases contenant DED/CARD compromet leur fonction de mort cellulaire mais préserve leur capacité à s'engager dans d'autres processus biologiques, comme les réponses inflammatoires [595,596].

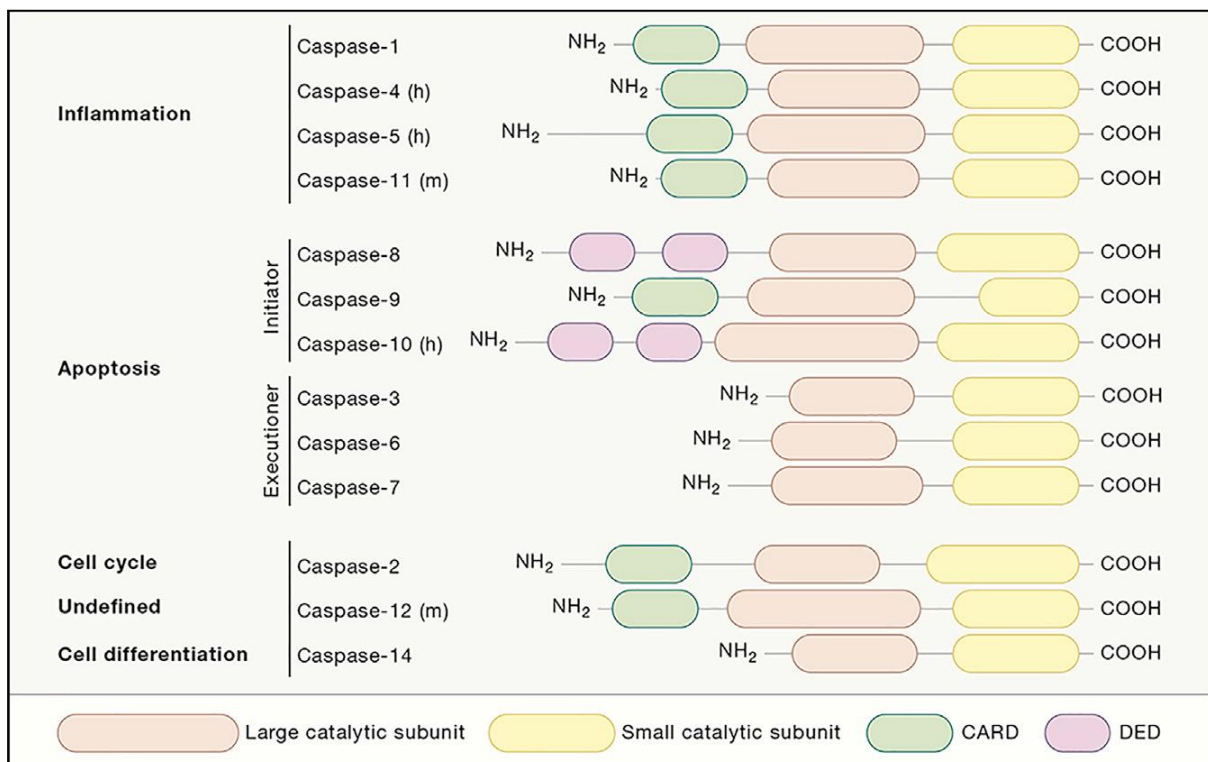


Figure 20. Classification fonctionnelle et architecture des domaines des caspases murines (m) et humaines (h) [597].

Les caspases inflammatoires (caspase-1, -4, -5 et -11) partagent un domaine CARD à l'extrémité N-terminale. Les caspases apoptotiques sont subdivisées en caspases initiatrices et caspases exécutoires. Les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) existent sous forme de zymogènes qui acquièrent une activité protéolytique lorsqu'ils sont recrutés dans des plateformes multiprotéiques qui favorisent leur auto-activation, comme le complexe de signalisation induisant la mort (DISC, *death-inducing signaling complex*), qui active les caspases-8 et -10, et l'apoptosome qui conduit à l'activation de la caspase-9 [598,599]. En plus d'autres groupes de protéases tels que les cathepsines et les granzymes, les caspases initiatrices clivent les caspases apoptotiques exécutoires (caspases-3, -6 et -7), dont l'activation aboutit

enfin à l'apoptose [600,601]. En outre, la caspase-2 partage des structures de domaine avec les caspases inflammatoires, mais sa fonction est décrite comme étant liée au cycle cellulaire. D'un point de vue structurel, la caspase-12 murine se regroupe avec les caspases inflammatoires ; elle favoriserait l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique. Cette caspase et d'autres caspases inflammatoires (caspases-1, -11 et -12 chez les rongeurs et caspases-1, -4 et -5 chez l'Homme) sont détournées de la signalisation de l'apoptose et contrôlent les réponses inflammatoires et de défense de l'hôte durant l'infection, en modulant la maturation et la sécrétion des médiateurs inflammatoires et en induisant une pyroptose cellulaire [602–605]. Comme indiqué dans les chapitres précédents, les caspases inflammatoires sont activées par l'assemblage du complexe macromoléculaire et oligomérique de l'inflammasome, aboutissant à l'activation de la pyroptose, avec l'activation et la sécrétion de molécules associées aux dangers (DAMPs) pour promouvoir l'inflammation [484,606].

Comme indiqué plus haut, la caspase-1 inflammatoire possède un domaine CARD en N-terminal, qui lui permet d'être recrutée dans les inflammasomes et qui favorisent sa dimérisation et son activation. La caspase-1 est produite en tant que précurseur cytosolique qui subit une auto-activation induite par la proximité. L'autoclivage de la caspase-1 humaine, après les résidus D103 et D122, libère le connecteur qui sépare le domaine de recrutement CARD en N-terminal du domaine catalytique. La suppression d'un second connecteur situé à l'intérieur du domaine protéasique par clivage après les résidus D297 et D316 déclenche des changements de conformation autour de la poche catalytique qui rendent la protéase active [607]. Des travaux récents sur la caspase-1 de souris ont toutefois montré que l'autotransformation de la caspase-1 n'est pas une condition préalable à son activation. Le recrutement de la caspase-1 dans des inflammasomes canoniques est suffisant pour son activation en l'absence d'autotransformation [608,609].

Le rapprochement conformationnel de deux pro-caspases-1 dans le complexe ainsi formé entraîne leur clivage autoprotéolytique et leur autoactivation. Sous sa forme active, la caspase-1 est un tétramère formé des deux paires des sous-unités p10 et p20. Une fois activée, la caspase-1 peut cliver et convertir les cytokines inflammatoires pro-IL-1 β et pro-IL-18 en leur formes bioactives dans la plupart des conditions pathologiques [556,602][610].

3.4.3 La gasdermine (GSDMD) et la pyroptose

La découverte de la GSDMD comme effecteur de la pyroptose a été une révélation dans la réponse inflammatoire induite par les inflammasomes [432,433]. Des études génétiques et protéomiques ont montré que le clivage de la GSDMD par les caspases-1 et -11 en N-terminal (GSDMD-NT : 30 kDa), entraîne la pyroptose dans les macrophages, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales et endothéliales humains [432,433,437]. La GSDMD-NT s'oligomérisent et se déplacent vers la membrane cellulaire où elle se lie aux lipides et forme des pores de 10 à 21 nm de diamètre. Ces pores favorisent la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 et IL-33 et la pyroptose cellulaire [435,436,438,439,611]. Cependant, des cytokines dépendantes de l'inflammasome peuvent être libérées, sans pyroptose, par des neutrophiles et des macrophages murins, des monocytes humains et des cellules dendritiques humaines et murines [408,581,612,613]. Dans les macrophages murins, les pores de la GSDMD peuvent contribuer à la libération de l'IL-1 β , mais ne médient pas entièrement la pyroptose si un nombre insuffisant de pores sont formés [614]. De plus, les pores induits par la GSDMD facilitent l'afflux de Ca²⁺ qui induit le recrutement des complexes endosomaux requis pour le transport ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), impliqués dans le remodelage de membranes (flexion, bourgeonnement), afin d'initier la restauration de l'intégrité de la membrane cellulaire. En effet, le knockdown des protéines de la machinerie ESCRT, via un siRNA, ou le blocage de l'influx calcique augmentent la pyroptose et la libération d'IL-1 β en réponse au LPS bactérien, ce qui suggère que cette voie pourrait faire partie intégrante du contrôle cellulaire de la pyroptose [615].

Dans les neutrophiles murins, la caspase-11 ou des protéases telles que l'élastase clivent la GSDMD, ce qui peut contribuer à la formation de pores induisant la mort cellulaire et/ou la libération de pièges extracellulaires des neutrophiles [407,616]. En outre, des stimuli induisant l'apoptose sur les BMDM murines et les cellules THP-1 provoquent le clivage de la GSDMD par les caspase-3 et -7, générant des fragments inactifs qui n'induisent pas la mort cellulaire lorsqu'ils sont surexprimés dans des cellules épithéliales humaines. Ces études indiquent que la GSDMD est un substrat pour de multiples enzymes et qu'il existe un chevauchement fonctionnel entre les voies enzymatiques de l'apoptose et la pyroptose [617,618]. Cependant, d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer la pertinence physiologique de ces voies de mort cellulaire interconnectées faisant intervenir la GSDMD.

L'activation de la GSDMD est intrinsèquement régulée par l'auto-inhibition de la GSDMD-NT par le domaine C-terminal [432,433,437]. Des preuves structurales confirment que les interactions intermoléculaires à deux sites entre les domaines N- et C-terminaux de la GSDMD facilitent cette auto-inhibition [619]. La glutathion peroxydase (GPX4), une enzyme impliquée dans l'homéostasie des lipides, régule également l'activité de la GSDMD. Plus précisément, GPX4 diminue la peroxydation lipidique cellulaire dans les cellules myéloïdes murines bloquant ainsi le clivage par la caspase-1/11 de la GSDMD et la formation des pores [620]. Une étude a montré que la formation des pores de la GSDMD-NT humaine est régulée par la teneur en cholestérol et en lipides des liposomes et des membranes lipidiques synthétiques [621]. En effet, la présence de phosphatidylinositolide (PI(4,5)P2) améliore la liaison à la membrane et l'oligomérisation de la GSDMD-NT, tandis que des quantités élevées de cholestérol dans les lipides synthétiques réduisent la formation de pores de GSDMD par rapport aux contrôles. Compte tenu de l'importance de la GSDMD dans la pyroptose, il sera particulièrement intéressant d'étudier si d'autres voies de régulation existent dans la pyroptose dans le contexte de l'activation de l'inflammasome et si la GSDMD est requise pour la pyroptose avec les inflammasomes nouvellement identifiés [621].

3.4.4 Les interleukines pro-inflammatoires associées aux inflammasomes

3.4.4.1 IL-1 β

L'IL-1 β est une cytokine majeure de la réponse inflammatoire, responsable de nombreuses fonctions telles que l'induction de la fièvre au niveau central (hypothalamus) ou la stimulation de la moelle osseuse à l'origine d'hyperleucocytose et de thrombocytose. Par ailleurs, elle peut activer directement les lymphocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales, ce qui entraîne le recrutement de polynucléaires neutrophiles et de cellules inflammatoires au site de l'infection. L'IL-1 β peut aussi induire sa propre expression et l'expression de gènes codant d'autres cytokines comme le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) ou l'IL-6, créant ainsi une véritable cascade inflammatoire [622,623].

L'IL-1 β est exprimée sous la forme d'un précurseur de 31 kDa, principalement en réponse à des stimuli inflammatoires. Cependant, la pro-IL-1 β entière ne peut pas se lier à son récepteur IL-1R (récepteur des IL-1) et doit d'abord être clivée en sa forme mature de 17 kDa [624]. L'enzyme de conversion de l'IL-1 β a été initialement décrite dans les monocytes et désignée sous le nom de caspase-1 [625,626]. Les souris dépourvues de caspase-1 sont très

résistantes au choc endotoxique induit par le LPS et présentent une diminution des quantités sériques d'IL-1 β et d'autres cytokines pro-inflammatoires, montrant le rôle clé de la caspase-1 dans la transformation de la pro-IL-1 β [602,627].

L'activation et la libération d'IL-1 β médiées par les inflammasomes (NLRP3 et NLRC4) nécessitent deux signaux distincts. Le premier signal (*priming*) peut être déclenché par divers PAMPs après activation des récepteurs TLR, qui induit l'activation de NF- κ B et des MAPKs, et déclenche ainsi la transcription de la pro-IL-1 β sous forme inactive. Le second signal est fourni par l'activation de l'inflammasome et de la caspase-1 et conduit à la transformation de l'IL-1 β . Cette régulation à deux niveaux minimise l'activation indésirable et potentiellement préjudiciable de l'IL-1 β [443,623].

3.4.4.2 IL-18

L'IL-18 est exprimée par la plupart des cellules humaines et animales sous la forme d'un précurseur inactif intracellulaire de 24 kDa. La caspase-1 clive la pro-IL-18 après le résidu Asp36 en une molécule active de 17,2 kDa qui est sécrétée par les cellules [556,557]. À ce jour, la caspase-1 est la seule protéase connue pour convertir l'IL-18 en sa forme active. Cependant, dans certains cas, une transformation de l'IL-18 indépendante de la caspase-1 peut être observée. Par exemple, la stimulation de Fas (ou CD95), récepteur de la famille des récepteurs du TNF impliqué dans l'apoptose, entraîne la libération d'IL-18 biologiquement active par des macrophages murins déficients en caspase-1 [443,628]. Ce phénomène est sensible aux inhibiteurs de la caspase, ce qui indique l'implication d'un autre membre de la famille des caspases. Il a récemment été montré que les macrophages déficients en caspase-8 ne sécrètent pas d'IL-18 (ni d'IL-1 β) en réponse à la stimulation de Fas. La caspase-8 est donc une enzyme candidate probable pour la maturation de la pro-IL-18 [629].

L'IL-18 est une cytokine principalement orientée vers une réponse de type T helper 1 (Th1), qui contribue aux réponses immunitaires en induisant la prolifération des cellules Th1, l'activation des cellules NK (*natural killer*), et la sécrétion d'interféron (IFN)- γ , cytokine qui induit l'activité microbicide des neutrophiles et des macrophages par de nombreux mécanismes antibactériens (dont la production d'oxyde nitrique) [630,631]. L'IL-18 favorise également la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8 et le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [623].

Les kératinocytes expriment et libèrent de manière constitutive la pro-IL-18 [632]. L'IL-18 a été impliquée dans plusieurs états inflammatoires de la peau mais son mécanisme d'activation reste obscur. Notamment, l'IL-18 peut être traitée par la chymase des mastocytes, qui clive la pro-IL-18 après le résidu Phe57, en aval du site de clivage de la caspase-1 [633]. Cependant, le produit de clivage de la pro-IL-18 induit par la chymase ne produit que 20 % de l'activité de l'IL-18 mature générée par la caspase-1. Par ailleurs, le produit IL-18 généré par la caspase-1 est résistant au clivage ultérieur médié par la chymase, ce qui suggère que l'IL-18 subit un changement de conformation lors de sa transformation par la caspase-1, ce qui est en accord avec d'autres résultats dans le cas de l'IL-1 β [634]. De plus, il a été rapporté que la transformation et la libération de l'IL-18 sont induites par la co-incubation de cellules épithéliales orales amorcées par l'IFN- γ avec la protéinase-3 dérivée des neutrophiles et le LPS, en l'absence de caspase-1. Cependant, la preuve de la transformation directe de l'IL-18 par la protéinase-3 n'a pas été démontrée [635]. L'ensemble de ces données suggère que les protéases telles que la chymase des mastocytes et le granzyme B libérés par les cellules cutanées résidentes peuvent contribuer à l'inflammation de la peau via l'activation de l'IL-18.

3.4.4.3 IL-33

L'IL-33 est un membre plus récemment identifié de la famille des cytokines IL-1. Cette interleukine agit sur un large panel de cellules de l'immunité innée, en induisant la production de cytokines et de chimiokines de type Th2, la maturation des mastocytes, la survie et l'expansion des éosinophiles et la polarisation M2 des macrophages [636]. Il a également été démontré que l'IL-33 active les cellules lymphoïdes innées du groupe 2 (ILC2) en association avec l'IL-7 ou la lymphopoïétine thymique stromale (TSLP, *Thymic stromal lymphopoietin*) [637]. Cela a un effet crucial sur les réponses allergiques des voies respiratoires assurant l'expansion et la migration des ILC2, la libération d'IL-5 et d'IL-13, suivies du recrutement des éosinophiles, de la production de mucus et de l'hyperréactivité des voies respiratoires. Ainsi, l'IL-33 affecte les cellules du système immunitaire inné et adaptatif et joue un rôle central dans la régulation des conditions inflammatoires. Par conséquent, l'IL-33 joue un rôle majeur dans un large éventail de maladies, notamment la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'asthme et les maladies pulmonaires obstructives chroniques [638,639].

Les premières études ont proposé que l'IL-33 soit activée par une transformation médiée par la caspase-1 [640]. Des études ultérieures ont démontré que, ni la caspase-1 recombinante,

ni la caspase-1 endogène ne peuvent cliver l'IL-33. En effet, l'IL-33 est clivée après le résidu Asp178 par les caspase-3 et -7 *in vitro* et dans les cellules apoptotiques, ce qui conduit à son inactivation [641]. Il est à noter que, comme l'IL-1 α , l'IL-33 présente une activité basale et ne nécessite pas systématiquement une maturation pour être active. Ces résultats ont été confirmés indépendamment par plusieurs études [558,642]. Il est désormais admis que l'IL-33 de 33 kDa est biologiquement active lorsqu'elle est libérée par les cellules endommagées, mais qu'elle peut subir une transformation par certaines protéases dérivées des neutrophiles pour amplifier son activité. La transformation de l'IL-33 par des caspases pro-apoptotiques pourrait représenter un mécanisme régulateur permettant de réduire l'activité pro-inflammatoire de l'IL-33 pendant l'apoptose [643].

3.5 Régulation des inflammasomes

3.5.1 La régulation transcriptionnelle des inflammasomes

La régulation transcriptionnelle a un impact profond sur les réponses de l'inflammasome car elle affecte la plupart des molécules de l'inflammasome, des récepteurs ou senseurs aux produits en aval de l'inflammasome (cytokines pro-inflammatoires, GSDMD). L'un des aspects clés de la régulation de la transcription est la régulation de l'accès de l'ARN Polymérase II (Pol II) et des facteurs de transcription (TF) à l'ADN. Les sites de liaison des TFs sont situés dans des séquences « promoteurs » de l'ADN à proximité du TSS (*transcription start site*) et favorisant le recrutement de la Pol II ou être situés à plusieurs mégabases du TSS dans des régions appelées « *enhancers* ou *silencers* ». La régulation de la transcription intègre donc des signaux provenant à la fois des régions du promoteur et de l'amplificateur/silencieux. Les TFs peuvent être classés en deux catégories : les TFs pionniers (par exemple, PU.1 et IRF : les facteurs de régulation de l'interféron (IRF) comptent 9 membres chez l'homme et 21 chez la souris) et les TFs dépendants du signal (par exemple, NF- κ B) [644]. En raison de la grande complexité de ce processus et de la multitude de sites de liaison des TFs affectant la transcription d'un gène particulier, presque chaque gène possède sa propre expression spatio-temporelle, bien que des processus communs puissent être observés.

Avant de développer la régulation transcriptionnelle spécifique des gènes des molécules des inflammasomes, nous allons donner un bref aperçu des molécules qui activent la voie de signalisation centrale NF- κ B qui contrôle la régulation transcriptionnelle, et qui nous intéresse tout particulièrement.

Actuellement, 28 domaines CARDs humains et 21 murins ont été identifiés [645]. Comme déjà décrit, les domaines CARD sont essentiels pour l'assemblage des complexes protéiques à la suite d'interactions intermoléculaires, la formation des inflammasomes et l'activation des caspases. Cependant, la famille des protéines contenant des CARDs s'est considérablement élargie au cours des dernières années, montrant que certaines de ces protéines contenant des CARD favorisent l'activation des caspases, d'autres, en particulier, NOD1 et NOD2, participent à l'activation des voies de signalisation de NF- κ B liées aux réponses immunitaires et enfin, certaines, en particulier ASC, jouent les deux rôles en activant à la fois des caspases et des voies de signalisation de NF- κ B [646,646–648]. Les protéines CARDs se divisent en quatre sous-groupes en fonction des domaines qu'elles partagent et de leur fonction (adaptateurs, protéines d'échafaudage, et molécules « piège » ou « decoy »).

3.5.1.1 Les protéines NBD-CARD

Ces protéines contiennent un domaine CARD en N-terminal, un domaine de liaison aux nucléotides NBD et, pour la plupart, des domaines riches en répétitions (répétitions en leucine ou WD-40) en C-terminal. Le domaine NBD agit comme une surface d'oligomérisation et la région répétée agit comme un domaine sensoriel qui régule l'oligomérisation, avec comme exemple les protéines NOD1 et NOD2 [647]. Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) est la première protéine identifiée dans ce sous-groupe. Elle agit comme un senseur de stress ou de dommage cellulaire lors de son activation par le cytochrome c libéré par les mitochondries [649]. Apaf-1 s'oligomérisise ensuite (via sa région NBD) et recrute la caspase-9 via des interactions CARD-CARD entre les deux protéines. Cela entraîne l'activation de la caspase-9 et par voie de conséquent l'apoptose [649]. NOD1 (CARD4) et NOD2 (CARD15) sont des homologues structurels d'Apaf-1 mais elle contiennent des répétitions riches en leucine (LRR) à la place des répétitions WD-40 en C-terminal [650–652]. Comme Apaf-1, les protéines NOD sont susceptibles de s'assembler en grands complexes protéiques en réponse à un stimulus approprié, mais leur rôle concerne principalement l'activation de NF- κ B, plutôt que celle des caspases, par le recrutement de la protéine bipartite CARD-kinase, RICK (*RIP-like interacting CLARP kinase*). Ce dernier peut interagir avec la sous-unité régulatrice I κ B, ce qui entraîne l'activation du complexe IKK et la phosphorylation ultérieure et la dégradation d'I κ B. Cela expose le signal de localisation nucléaire de NF- κ B, ce qui entraîne sa translocation vers le noyau et la transcription d'un certain nombre de gènes, dont beaucoup sont impliqués dans les processus pro-inflammatoires [653,654].

Inohara et al. ont montré que le LPS entraînait l'activation de NF- κ B d'une manière NOD-dépendante. En outre, le LPS se lie directement à NOD1 par l'intermédiaire de son domaine LRR. Ainsi, les protéines NOD fonctionnent comme des récepteurs intracellulaires de pathogènes, qui possèdent un LPS, pour déclencher leur activation. L'activation NF- κ B-dépendante de NOD peut servir à initier des réponses immunitaires contre les pathogènes intracellulaires par la transcription d'IL-1, d'IL-8 et d'autres cytokines pro-inflammatoires [655,656].

NOD2 (CARD15) est identifié comme un récepteur des pathogènes bactériens au niveau intestinal. Des études génétiques ont permis de localiser un locus de susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite ulcéreuse) près du centromère du chromosome 16. Or le gène *NOD2* se situe dans cette région, en 16q12, et plusieurs études ont montré qu'une proportion très importante de personnes atteintes de la maladie de Crohn présentent des mutations de type « frameshift » dans la région LRR de NOD2, entraînant l'expression d'une protéine NOD2 tronquée dans le domaine LRR. Bien que le mécanisme reste inconnu, l'hypothèse proposée est que la protéine NOD2 tronquée en LRR est probablement une protéine défectueuse qui répond aux bactéries entériques d'une manière inappropriée [657–659].

3.5.1.2 Les protéines CC-CARDs

Les protéines CARD à bobine spiralée (CC-CARD, *coiled-coil-CARD*) ont une structure très similaire à celle des NBD-CARD, mais le NBD central est remplacé par un motif en spirale qui agit également comme une surface d'oligomérisation. Ce sous-groupe agit probablement comme des protéines d'échafaudage, ou « *scaffold* », pour l'assemblage de complexes d'activation de protéines [647]. Toutes ces protéines semblent activer NF- κ B suite à une interaction avec BCL10 (*B-cell lymphoma/leukemia* 10), protéine bipartite avec un domaine riche en Ser/Thr impliquée dans l'apoptose et l'activation de NF- κ B, et dont la translocation du gène est associée au lymphomes [660]. BCL10 favorise l'activation de NF- κ B, probablement par le recrutement indirect de IKK γ via MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein* 1) [661]. MALT1 est une paracaspase impliquée dans l'activation des lymphocytes T et B et contient un domaine de type caspase en plus d'un domaine de mort DD. Ainsi, BCL10 favorise l'activation de NF- κ B en formant un complexe avec la paracaspase MALT1 [661]. Quatre CC-CARD peuvent interagir avec BCL10 : CARD-9, CARD-10 (CARMA3, BIMP1 chez la souris), CARD11 (CARMA1, BIMP2 chez la souris) et CARD14,

CARMA2, BIMP3 chez la souris) [662–664]. D'autres études suggèrent, qu'en plus de BCL10, RICK est également nécessaire pour une signalisation NF- κ B appropriée au niveau des récepteurs des cellules T [665–667].

3.5.1.3 Les CARDs bipartites

Ces protéines contiennent un domaine CARD et un autre motif tel qu'un domaine kinase, un domaine de mort DD, un motif PYD ou un domaine protéase. Certaines de ces protéines sont recrutées par les NBD-CARD et activées dans le cadre des inflammasomes et d'autres recrutent des molécules effectrices supplémentaires dans le complexe, comme la sous-unité I κ B kinase (IKK γ /NEMO) pour entraîner l'activation de NF- κ B [647]. Ainsi, par exemple, BCL10 possède un domaine CARD et un domaine riche en Ser/Thr et RICK, pour sa part, possède un domaine CARD et un domaine kinase. Ces deux protéines sont recrutées par plusieurs CARDs multi-domaines pour entraîner l'activation de NF- κ B, par le recrutement d'IKK γ [667,668]. ARC (*apoptosis repressor with CARD*), une autre CARD bipartite, joue un rôle inhibiteur de l'apoptose via une interaction directe avec les caspases-2 et -8 [669]. Les caspases qui contiennent des motifs CARD en N-terminal font également partie de la catégorie des CARD bipartites. Les caspases contenant des CARDs sont recrutées par d'autres protéines CARDs pour initier les cascades de signalisation des caspases (la caspase-9/APAF-1, la caspase-8/FADD, et ASC/caspase-1) [533,598,670].

L'une des protéines CARD bipartites la plus importante dans l'activation des inflammasomes et l'activation de la caspase-1 est ASC. Il a été montré que ASC, qui contient un domaine PYD ainsi qu'un motif CARD, forme des agrégats dans les cellules apoptotiques et joue un rôle dans les processus inflammatoires [552]. En effet, ASC joue un rôle central dans l'assemblage de l'inflammasome, représentant l'unité minimale capable de former des foyers en conjonction avec le domaine CARD de la caspase-1. Des études mutationnelles indiquent que plusieurs régions du domaine CARD d'ASC et deux régions prédominantes du CARD de la Caspase-1 permettent la formation de foyers ASC/Caspase-1. L'absence de formation de foyers pour les mutants d'ASC-CARD est en corrélation avec une perte de la maturation de l'IL-1 β en réponse aux agonistes de NLRP3 ou d'AIM2 dans des essais de reconstitution cellulaire sur la lignée macrophagique murine RAW264.7 [671]. De plus, la formation de l'inflammasome NLRC4 (IPAF) induite par *S. Typhimurium* dépend de la formation de la plateforme médiée par ASC-CARD, favorisant ainsi l'activation de la pro-caspase-1, ainsi que le clivage de la gasdermine conduisant à la pyroptose cellulaire [438,534,671–674]. Des études ont montré que

ASC est un médiateur de l'activation de NF- κ B et de l'apoptose via l'activation des inflammasomes NLRC4 dépendante de l'activation de la caspase-8. En effet, l'apoptose induite par ASC est inhibée par une forme mutante de la caspase-8, mais pas par celle de la caspase-1, et l'activation de NF- κ B médiée par ASC induit l'expression notamment d'IL-8 [675,676]. Tous ces résultats valident le fait que la co-expression d'ASC avec les protéines des inflammasomes ou l'oligomérisation d'ASC induit à la fois l'apoptose suite à une activation des caspases et l'activation de NF- κ B, favorisant l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires [647].

3.5.1.4 Les protéines « CARD-only »

Ces protéines contiennent un domaine CARD mais ne possèdent pas de motifs supplémentaires reconnaissables. Les protéines CARD-only peuvent agir comme des régulateurs positifs ou négatifs des CARDS à domaines multiples en entrant en compétition avec les CARD bipartites pour la liaison à leurs cibles par exemple [647]. Un petit nombre de protéines ne contenant que des motifs CARD a été décrit. Cette catégorie comprend ICEBERG et pseudo-ICE/COP [677–679]. Ces molécules sont susceptibles d'agir comme des molécules « *decoys* » qui peuvent entrer en compétition avec d'autres protéines CARDS pour se lier aux CARDS bipartites ou multidomaines et, de cette façon, fonctionner comme des inhibiteurs des voies d'activation des caspases ou de NF- κ B. Les 2 molécules ICEBERG/CARD18 et pseudo-ICE (*pseudo-interleukin-1 beta converting enzyme*) antagonisent l'activation de la caspase-1 et la maturation de l'IL-1 β [677,678].

3.5.2 La régulation transcriptionnelle des récepteurs/senseurs des inflammasomes

Des études récentes montrent que la plupart des molécules de l'inflammasome sont régulées au niveau transcriptionnel. En effet, cette régulation est contrôlée majoritairement par la voie de signalisation de NF- κ B, qui est la plupart du temps activée par des molécules CARD comme NOD1, NOD2 et ASC, la régulation transcriptionnelle des autres molécules pouvant être contrôlée par la famille des IRF.

3.5.2.1 NLRP1

L'expression des gènes *NLRP1a* et de *NLRP1c* est régulée positivement par SREBP-1A (*sterol regulatory element binding protein-1A*). SREBP-1A se lie directement à un site de

liaison canonique de SREBP-1 dans le promoteur proximal de *NLRP1A*. L'expression de *SREBP-1A* est elle-même sous le contrôle direct de NF- κ B, qui contrôle indirectement l'expression de *NLRP1a* dans les macrophages [559].

3.5.2.2 NLRP3

NLRP3 présente une transcription contrôlée par NF- κ B. La régulation de *NLRP3* est déclenchée par le ligand muramyl dipeptide de NOD2 ou par les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 α et IL-1 β , en l'absence de PAMPs [448]. Deux sites de liaison NF- κ B sont présents dans le promoteur de *NLRP3*. Lors du traitement par le LPS, la sous-unité RelA/p65 de NF- κ B se lie au promoteur de *NLRP3* [680]. La régulation positive de *NLRP3* après l'activation de NF- κ B dépend partiellement d'un I κ Bs (inhibiteur de κ B) atypique, un coactivateur de NF- κ B dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) [681].

3.5.2.3 NAIP/NLRC4

La famille IRF (facteurs de régulation des interférons) peut contrôler la régulation transcriptionnelle de certains récepteurs/senseurs des inflammasomes. IRF8 a été identifié chez la souris comme un régulateur positif de *NAIP2*, *NAIP5* et *NAIP6*, en se liant à leurs régions promotrices, ainsi que de *NLRC4* par la liaison à une région intronique du gène, avec une très faible activité intrinsèque de liaison à l'ADN [682]. En conséquence, les souris *Irf8*^{-/-} sont très sensibles à *S. Typhimurium* [529]. *IRF8* est induit lors d'une infection par *Legionella* et pourrait participer à la réponse NAIP/NLRC4-dépendante contre ce pathogène exprimant la flagelline [683]. De manière surprenante, la surexpression d'*IRF8* dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse diminue l'expression de *NLRC4*. De plus, IRF8 inhibe l'expression de *NLRC4* [684].

3.5.2.4 ASC

NF- κ B p65/RelA et C/EBP β ont des sites de liaison putatifs dans le promoteur de PYCARD (gène codant ASC), et l'expression ectopique de ces facteurs de transcription dans un système rapporteur sur cellules HEK293 augmente l'activité du promoteur de PYCARD [685].

3.5.3 La régulation transcriptionnelle des caspases et de leurs cibles

3.5.3.1 Caspase-1

IRF2 se lie au promoteur du gène *CASP1* dans les monocytes humains primaires et les monocytes U937 déficients en IRF2 présentent une forte diminution des niveaux de caspase-1 [686,687]. L'IFN- γ , qui induit fortement IRF1, régule l'expression de *CASP1* [688]. En revanche, les souris *Irf2*^{-/-} et les macrophages murins ne présentent pas de défaut majeur au niveau de la caspase-1, ce qui suggère des différences dans la régulation basale du gène de caspase-1 chez les souris et les humains [689,690]. Un autre membre de la famille IRF, IRF8, contrôle également l'expression de *CASP1*, comme le montre son rôle au cours de l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) [691]. L'absence d'IRF8 dans plusieurs lignées cellulaires lymphoblastoïdes EBV+ abolit complètement l'expression de *CASP1*. IRF8 se lie à la séquence ISRE consensus dans le promoteur proximal de *CASP1* et agit en synergie avec IRF1 pour contrôler l'activité du promoteur de *CASP1*, ce qui suggère que IRF8 se lie à l'ADN dans un complexe ternaire avec IRF1 [682].

Au delà de la régulation transcriptionnelle, un certain nombre de protéines ont été décrites comme pouvant se lier à la caspase-1 et potentiellement réguler son activation. Comme il a été mentionné plus haut, RICK, la kinase contenant des CARDs, se lie à la caspase-1 et favorise faiblement l'activation de la caspase-1 après surexpression [692]. RICK induit l'oligomérisation des molécules de caspase-1 conduisant à l'activation de cette dernière, probablement en interagissant avec la sous-unité régulatrice I κ B et en activant NF- κ B (voir partie ci-dessus). L'inactivation ciblée de RICK a produit des défauts dans les voies d'activation du NF- κ B [693]. De plus, deux autres protéines CARD (ICEBERG et pseudoICE/COP), qui sont très similaires à la CARD de la caspase-1 et peuvent se lier à la caspase-1, ont été suggérés comme pouvant perturber l'oligomérisation médiée par RICK de cette caspase [677–679].

3.5.3.2 Caspase-4

IRF2 est un régulateur clé du gène de la caspase-4, qui se lie au promoteur de *CASP4* dans les monocytes humains primaires [686]. En présence d'IFN- γ , IRF1 peut combler l'absence d'IRF2 pour réguler les niveaux de caspase-4. Cette régulation de *CASP4* par IRF2 n'est pas observée au niveau protéique dans la lignée cellulaire EA.hy926 (un hybride de cellules A549 et de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine), ce qui suggère que la dépendance de l'expression de *CASP4* vis-à-vis des IRF pourrait différer entre les différents types de cellules [689]. En plus d'IRF1/2, la sous-unité RelA de NF- κ B régule l'expression de *CASP4* via sa

liaison sur un site de liaison de NF- κ B situé à environ 1000 pb en amont du TSS (*transcription start site*) de *CASP4* [694].

3.5.3.3 Caspase-5

La caspase-5 est exprimée à des niveaux faibles dans divers organes, avec une expression prédominante dans la rate et dans le côlon [695]. Son expression est fortement induite *in vitro* après un traitement par LPS ou par IFN [696,697]. Trois sites de liaison pour NF- κ B sont présents dans le promoteur de *CASP5*, mais leur fonctionnalité doit encore être testée expérimentalement. La pertinence de l'induction de *CASP5* dans les maladies n'est pas encore claire, bien qu'une forte augmentation du niveau d'expression de ce gène (20 fois plus) soit observée dans les lésions de la peau chez les patients atteints de psoriasis, une maladie auto-immune de la peau [698].

3.5.3.4 Caspase-11

L'expression de *CASP11* est induite en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, comme le LPS, ou par l'IFN [699,700]. Schauvliege et al. (2002) ont validé la présence d'un site de liaison de NF- κ B dans le promoteur de *CASP11* nécessaire à la transcription du gène en réponse au LPS. Plusieurs sous-unités de NF- κ B se lient à ce site lors de la stimulation par le LPS. En présence de l'IFN- γ , STAT1 se lie à un motif GAS dans le promoteur de *CASP11* et la mutation de ce motif invalide à la fois l'expression de caspase-11 induite par l'IFN- γ et par le LPS [699].

3.5.3.5 Gasdermine D

Comme indiqué plus haut, après le clivage de la GSDMD par les caspases pro-inflammatoires, les fragments N-terminaux s'oligomérisent dans la membrane plasmique pour former un pore transmembranaire, responsable de la pyroptose [432,433]. IRF2 régule l'expression du gène de la GSDMD, en se liant à une séquence ISRE dans le promoteur du gène *GSDMD* [689]. Les souris *Irf2*^{-/-} n'expriment pas la GSDMD et les BMDM *Irf2*^{-/-} présentent un défaut profond d'inflammasome. Dans les cellules humaines, le knockout d'*IRF2* dans les cellules EA.hy926 a confirmé le rôle clé d'IRF2 dans le contrôle de l'expression de *GSDMD* [689]. Aucun impact majeur a été observé dans la lignée cellulaire monocytique U937 en l'absence d'IRF2, ce qui suggère que IRF2 régule la GSDMD de manière spécifique au type cellulaire [686]. IRF1 et IRF2 ont la même spécificité de liaison pour la séquence ISRE. Par

conséquent, et comme décrit ci-dessus pour la régulation de la GSDMD, en l'absence d'IRF2, IRF1 joue un rôle compensatoire et contrôle partiellement l'expression de GSDMD [689,701].

3.5.3.6 IL-18

Le promoteur du gène *IL18* comprend une PU-box (séquence riche en purine liant PU.1), des séquences de reconnaissance de NF- κ B, un site ISRE qui a été décrit à l'origine pour favoriser l'induction dépendante d'IRF-8 d'IL18 dans les macrophages, et enfin des éléments GAS (*gamma interferon activation site*), des courtes séquences d'ADN requises pour l'induction de la transcription rapide de gènes en réponse à l'IFN- γ . [702,703].

Ainsi, l'expression d'*IL18* dans les monocytes humains peut être induite par la stimulation par le LPS d'une manière dépendante de JAK/STAT. L'induction de la transcription d'*IL18* nécessite à la fois l'activation de NF- κ B et la signalisation de l'IFN de type I, ce qui entraîne un retard de la cinétique d'induction du gène de l'IL-18 par rapport à celle de l'induction de celui de l'IL-1 β (gène précoce immédiat) [703]. De même, la signalisation de l'IFN de type I est essentielle pour l'induction d'*IL18* dans les BMDM murins traités par du LPS. STAT1 et IRF9 sont spécifiquement requis pour cette activité. L'implication de STAT1 et IRF9 suggère que le facteur génique 3 stimulé par l'IFN (ISGF3), un complexe protéique ternaire composé d'IRF9, de STAT1 et de STAT2, et fonctionnant comme un facteur de transcription en aval des récepteurs IFN de type I, est un régulateur direct de l'expression d'*IL18* [704].

3.5.3.7 IL-1 β

IRF4 et IRF8 participent à la transcription dynamique du gène de l'IL-1 β (IL1 β) après traitement par le LPS dans les monocytes humains [705]. L'importance de ces deux TFs n'est pas claire puisque, d'une part, les macrophages déficients en IRF8 ne présentent pas de défaut évident d'IL-1 β et, d'autre part, l'expression ectopique d'IRF4 ou d'IRF8 dans les macrophages murins inhibe l'expression du gène d'IL-1 β [529,684].

Le rôle de NF- κ B a été clairement établi après des traitements avec des stimuli microbiens (LPS) ou des stimuli pro-inflammatoires non infectieux. L'induction de la synthèse d'IL-1 β suite à une activation des TLRs est largement médiée par MYD88 [704]. p65/RelA est recruté au niveau du promoteur d'IL1 β de manière dépendante du signal, tandis que c-Jun, dont l'expression est induite par les MAPKs via une activation des TLRs, est à la fois lié de manière constitutive à l'amplificateur proximal d'IL1 β et recruté de manière inductible à l'amplificateur distal et au promoteur [705]. L'expression inductible d'IL1 β en réponse à des signaux pro-

inflammatoires est liée à une région amplificatrice située à -3757 et -2729 pb en amont du TSS. L'induction dépend de la liaison de C/EBP β à ce site amplificateur et d'un bouclage chromatinien de longue portée qui permet à C/EBP β d'interagir directement avec PU.1, qui est lié au promoteur proximal [706,707]. De plus, la liaison des sous-unités de NF- κ B (RelA/p65, NF- κ B1 (p50), c-Rel (p85)) dans la région du promoteur proximal contribue à l'induction d'IL1 β [708]. NF- κ B interagit avec PU.1 [707]. La transcription d'IL1 β induite par le LPS résulte donc de la coopération intime du TF dépendant du signal NF- κ B avec les TFs pionniers C/EBP β et PU.1. C/EBP β recrute le facteur d'élongation transcriptionnel positif P-TEFb au niveau du promoteur de l'IL1 β . P-TEFb phosphoryle la partie C-terminale de Pol II et favorise l'élongation de la transcription [707]. De plus, l'expression d'IL1 β est régulée négativement par l'IL-10 d'une manière dépendante de STAT3. Les IFN de type I, qui induisent l'IL-10, régulent également négativement la transcription d'IL1 β dans les BMDM murins et dans les monocytes primaires humains [709].

3.5.3.8 IL-33

Griffith et al. ont montré en 2021 que le gène *IL33* présente des séquences pour plusieurs facteurs de transcription, y compris des motifs ETS et AP-1. De plus, ils ont révélé que c-Jun, un composant de AP-1, régule l'expression du gène *IL33* en se liant à son amplificateur d'une manière dépendante de la kinase d'adhésion focale (FAK) [710]. La plupart des études détaillant la régulation transcriptionnelle d'*IL33* ont montré que l'IL-33 non mature interagit avec le facteur de transcription NF- κ B. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que cette interaction se produit entre la partie N-terminale de l'IL-33 (AA 66-109) et le domaine d'homologie Rel (N-terminal) de NF- κ B p65, contribuant à la réduction de la liaison de NF- κ B p65 à son ADN de référence et à l'altération de la transactivation déclenchée par p65 [711]. Des analyses en qRT-PCR et en Western blot ont montré que l'IL-33 est un régulateur transcriptionnel de la sous-unité p65 du complexe NF- κ B et qu'elle est impliquée dans l'activation des cellules endothéliales. L'expression d'ICAM-1/VCAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire-1/molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1) induite par l'IL-33 dépend de l'effet régulateur de l'IL-33 sur NF- κ B ; l'expression de NF- κ B p65 est augmentée par la surexpression de l'IL-33 et, à l'inverse, réduite par la suppression de l'IL-33 [712].

3.5.4 La régulation post-traductionnelle des inflammasomes

Le traitement protéolytique constitue un mécanisme post-traductionnel de régulation des effecteurs du système immunitaire inné. Par exemple, les cytokines IL-1 β et IL-18 dépendantes de l'inflammasome sont exprimées sous forme de monomères inactifs qui ne peuvent pas se lier à leurs récepteurs [443,713]. L'élimination de leurs domaines auto-inhibiteurs par le clivage protéolytique dépendant de l'activation de l'inflammasome leur permet de se lier à leurs récepteurs [626,714,715]. Un autre exemple de cette régulation post-traductionnelle est fourni par une kinase polyvalente, la sérine/thréonine kinase 1, interagissant avec les récepteurs (RIPK1). RIPK1 est entièrement fonctionnelle. Cependant, la caspase-8 clive protéolytiquement RIPK1 en deux fragments et inhibe ainsi les processus dépendant de la fonction d'échafaudage ou « *scaffold* » de RIPK1 [716,717]. Des études récentes ont montré que la fonction du récepteur de l'inflammasome NLRP1B est également régulée par le clivage protéolytique, le protéasome éliminant le domaine inhibiteur en N-terminal pour contrôler l'activation [718,719].

Dans le présent travail de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de la flagelline FliC de *C. difficile* dans la réponse inflammatoire intestinale et tout particulièrement dans l'activation d'une autre voie pro-inflammatoire que celle liée à TLR5, la voie de l'inflammasome. Les flagellines bactériennes, notamment des bactéries intracellulaires, pouvant activer l'inflammasome NLRC4/NAIP5, nous nous sommes focalisés sur la voie d'activation de cet inflammasome après l'internalisation de la flagelline dans les cellules épithéliales intestinales, alors que *C. difficile* est un pathogène extracellulaire. En activant, d'une part, le TLR5 exposé à la surface des cellules et, d'autre part, les inflammasomes dans le cytosol, la flagelline contribuerait à amplifier la réponse inflammatoire de l'hôte et ainsi aux lésions épithéliales au cours de l'infection à *C. difficile*.

Travaux personnels

Travaux personnels

I. Objectifs scientifiques

La protéine structurale des flagelles FliC de *C. difficile* active la voie de signalisation TLR5 avec pour conséquence l'induction d'une réponse pro-inflammatoire épithéliale intestinale, contribuant ainsi, avec les toxines et d'autres facteurs de virulence de la bactérie, aux lésions de la muqueuse. Alors que la bactérie n'est pas internalisée dans les cellules épithéliales, des produits bactériens comme les toxines atteignent leurs cibles dans le cytosol cellulaire après endocytose. Nous formulons l'hypothèse que les monomères de flagelline de *C. difficile* peuvent être internalisés et interagir avec des senseurs cellulaires cytosoliques et induire l'activation des inflammasomes.

L'objectif principal de ce travail de thèse consiste à étudier l'activation des inflammasomes par la flagelline FliC de *C. difficile* après son internalisation dans un modèle de cellules épithéliales intestinales afin de mieux définir son rôle dans l'amplification de la réponse inflammatoire intestinale lors de l'infection par la bactérie.

1. Etude de l'internalisation de la flagelline FliC de *C. difficile* dans un modèle de cellules épithéliales intestinales Caco-2/TC7
2. Analyse *in vitro* de l'activation de l'inflammasome NLRC4 induite par la flagelline FliC, dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2/TC7
 - 2.1. Etude de l'activation des effecteurs des voies de signalisation de NLRC4 : phosphorylation de NLRC4, activation/clivage de la pro-caspase-1, clivage de la gasdermine D.
 - 2.2. Etude de l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'inflammasome NLRC4 et des cytokines pro-inflammatoires spécifiques de l'inflammasome Il-1 β , IL-18 et IL-33.
 - 2.3. Mise en évidence de la production d'IL-18 induite par FliC.

II. Publication

***Clostridioides difficile* flagellin activates the intracellular NLRC4 inflammasome**

Hiba Chebly, Jean-Christophe Marvaud, Layale Safa, Assem Khalil Al Kak, Philippe Hussein Kobeissy, Imad Kansau and Cécile Larrazet

1- Introduction

Récemment, nous avons montré que la flagelline FliC de *C. difficile* contribue, avec les toxines, à l'induction d'une réponse pro-inflammatoire favorisant ainsi les dommages de la muqueuse intestinale provoqués par l'infection à *C. difficile*. En effet, FliC interagit avec le récepteur TLR5 de l'immunité innée pour activer les voies de signalisation NF- κ B et MAPK, entraînant une réponse pro-inflammatoire. Par ailleurs, la flagelline de *Salmonella* est connue pour activer les voies de signalisation de l'inflammasome, en particulier l'inflammasome NAIP-NLRC4.

Les flagellines de bactéries pathogènes intracellulaires activent également la voie de signalisation des inflammasomes induisant ainsi la pyroptose cellulaire (mort cellulaire inflammatoire programmée) et le relargage des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Alors que *C. difficile* est une bactérie pathogène extracellulaire, sa flagelline pourrait être internalisée par les cellules épithéliales et/ou immunitaires et par la suite, être détectée par les senseurs intracellulaires de PAMPs et ainsi activer les voies de signalisation pro-inflammatoires qui contribueraient à amplifier la réponse pro-inflammatoire.

Notre premier objectif était alors de détecter l'internalisation de FliC. Pour ce faire, nous avons produit une protéine FliC recombinante couplée à la GFP (GFP-FliC) en utilisant la technique du Golden Gate. L'analyse par microscopie confocale nous a permis de détecter l'internalisation de FliC au cours du temps dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2/TC7. A la suite de cette constatation, nous avons étudié le rôle de FliC et notamment de sa région C-terminale dans l'activation des effecteurs de l'inflammasome NLRC4 connu pour être activé par les flagellines bactériennes. Nous avons mis en évidence une colocalisation entre GFP-FliC et la pro-caspase-1 dans les cellules, ainsi que le clivage/activation de la pro-caspase-1, l'activation de la gasdermine D et la surexpression des gènes codant les interleukines IL-1 β , IL-18 et IL-33 des inflammasomes, suggérant la formation de l'inflammasome NLRC4. De plus, il a été montré une régulation de cette voie des inflammasomes par la voie de signalisation

NF- κ B, montrant le rôle essentiel de ce facteur de transcription central dans la régulation de la réponse inflammatoire médiée par FliC.

2- La flagelline de *C. difficile* est internalisée par les cellules épithéliales intestinales.

La flagelline de *C. difficile* a été fusionnée via son extrémité N-terminale avec la protéine fluorescente GFP (GFP-FliC). Cette construction permet d'exposer la région C-terminale de FliC homologue aux autres flagellines de pathogènes intracellulaires et sensée être impliquée dans l'activation de l'inflammasome. Les cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2/TC7 ont été incubées avec la GFP-FliC ou la GFP comme contrôle. La cinétique d'internalisation de la flagelline a été suivie par microscope confocal. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de la GFP-FliC a été mesurée soit au niveau des sections z optiques au pôle apical des cellules ("TC7-Surface"), soit au niveau des sections z optiques médianes correspondant à l'intérieur des cellules ("TC7-Intracellulaire"). L'analyse des images et du MFI a montré qu'après 2 h d'incubation, la plupart de la GFP-FliC était localisée à la surface des cellules. En revanche, après 4 h et 6 h d'incubation, la MFI de la GFP-FliC a progressivement diminué à la surface cellulaire alors qu'elle a augmenté à l'intérieur des cellules. Le MFI de la protéine GFP était proche de zéro pendant la période d'incubation, indiquant que la GFP n'a pas adhéré au pôle apical des cellules, ni a été internalisée. **Ces résultats montrent que la flagelline FliC de *C. difficile* est internalisée par les cellules Caco-2/TC7.**

3- La flagelline de *C. difficile* induit l'activation des effecteurs des voies de signalisation des inflammasomes NLRC4.

Après son internalisation dans les cellules épithéliales intestinales, FliC peut interagir avec les senseurs/effecteurs cytoplasmiques impliqués dans les voies de signalisation des inflammasomes NLRC4. Nous avons alors évalué la phosphorylation de NLRC4 sur le résidu Ser533, connue pour être la modification post-traductionnelle responsable de l'activation de cet inflammasome, après une stimulation des cellules soit par FliC soit par la flagelline de *Salmonella* Typhimurium (FlaST), connue pour être internalisée et activer NLRC4, pendant 2 à 8 h, ou par l'inducteur de l'inflammasome NLRC4 LFn-Needle (protéine recombinante du facteur létal de *B. anthracis*) pendant 2 h, ces deux derniers inducteurs des inflammasomes ayant servi comme contrôles positifs. La stimulation par FliC a été associée à la phosphorylation

du résidu Ser533 de NLRC4 suggérant l'activation de l'inflammasome NLRC4. Pour confirmer ces résultats, nous avons produit une flagelline de *C. difficile* tronquée (FliC Δ 286-290) déléetée de cinq acides aminés dans la partie C-terminale, y compris les deux leucines décrites comme essentielles pour la reconnaissance par NAIP, composant jouant un rôle dans l'activation initiale de l'inflammasome NAIP/NLRC4. Après 4 h de stimulation des cellules Caco-2/TC7 avec FliC Δ 286-290, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de NLRC4 par rapport à celle observée lorsque les cellules sont stimulées par FliC entier ou par les contrôles positifs FlaST et LFn-Needle.

Nous avons montré ensuite que l'activation de NLRC4 par FliC entraîne l'activation de la pro-caspase-1 et son clivage en deux composants p20 et p10. Les cellules ont été incubées avec FliC ou FlaST pendant 2 à 8 h, ou avec du TNF α comme contrôle positif pendant 1 h. Nous avons observé que FliC ou FlaST induisent une augmentation de la libération de la sous-unité p20 avec un maximum après 4 h et 6 h de stimulation. Cette activation de la caspase-1 par son clivage a été significativement réduite par le traitement préalable des cellules avec l'inhibiteur spécifique de la pro-caspase-1, VX-765. De plus, à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la pro-caspase-1 en microscopie confocale, nous avons mis en évidence une colocalisation de la GFP-FliC avec la pro-caspase-1 après 6 h d'incubation, suggérant une interaction entre FliC et l'inflammasome NLRC4 impliquant la pro-caspase-1.

L'activation des caspases pro-inflammatoires peut conduire à la pyroptose par le clivage de la gasdermine (GSDMD), entraînant l'assemblage de la GSDMD clivée dans la membrane pour former des pores et déclencher la pyroptose. Ainsi, l'analyse par immunoblot du niveau de GSDMD non activée a montré qu'après stimulation par FliC, une diminution de la GSDMD est observée, suggérant un clivage de cette protéine. Cette diminution de la forme non activée, n'a pas été détectée lorsque les cellules ont été traitées au préalable par l'inhibiteur de la pro-caspase-1 VX-756 (25 et 50 μ M), suggérant qu'un clivage de la GSDMD a lieu après l'activation de la pro-caspase-1 induite par FliC.

L'ensemble de ces résultats suggère que FliC active NLRC4 via la phosphorylation sur son résidu Ser533, et que la partie C-terminale de la flagelline est nécessaire à cette activation. L'activation de NLRC4 conduirait ainsi à la formation de l'inflammasome NLRC4 et à l'activation ultérieure par clivage de la pro-caspase-1, avec la libération de la p20, responsable du clivage et de l'activation de la GSDMD.

4- La flagelline de *C. difficile* induit l'expression du gène de la pro-caspase-1 et des gènes des cytokines liées à l'inflammasome ainsi que la synthèse d'IL-18 d'une manière dépendante de NF-κB.

L'activation de l'inflammasome NLRC4 conduit à la synthèse de cytokines spécifiques, telles que l'IL-1β, l'IL-18 et l'IL-33. Dans le contexte de l'activation de NLRC4 par FliC, nous avons étudié par qRT-PCR l'expression des gènes de ces cytokines dans les cellules Caco-2/TC7. Une augmentation de l'expression des gènes codant l'IL-1β, l'IL-18 et IL-33 a été observée, avec une cinétique différente de leur expression. En effet, une augmentation des gènes *IL18* et *IL33* a atteint le pic après 6 h de stimulation des cellules par FliC, alors que l'expression d'*IL1β* a augmenté plus rapidement et a été maximale (20 fois) après 2 h de stimulation par FliC. Cette augmentation de l'expression des gènes n'a pas été obtenue après stimulation des cellules par FliC_{Δ286-290} tronquée, ce qui suggère que les cinq acides aminés délétés de la région C-terminale de FliC sont essentiels pour l'expression des gènes codant les cytokines liées aux inflammasomes. Par ailleurs, une augmentation de l'expression du gène *CASP1* codant la pro-caspase-1 a été également observée après stimulation par FliC avec un pic après 6 h de stimulation. En outre, l'inhibition de la voie de signalisation de NF-κB par l'inhibiteur chimique d'IKKα BMS 345541 a aboli l'expression des gènes codant l'IL-18, IL-33 et la pro-caspase-1.

La synthèse de l'IL-18 a été évaluée par ELISA dans le surnageant de culture des cellules Caco-2/TC7 stimulées par FliC, FlaST ou FliC_{Δ286-290} tronquée au cours du temps. FliC, tout comme FlaST, a induit la synthèse d'IL-18 après 6 à 8 h de stimulation, par rapport aux cellules non stimulées. En revanche, après stimulation des cellules par FliC_{Δ286-290} tronqué, aucune augmentation de la synthèse d'IL-18 n'a été observé, confirmant le rôle essentiel de la région C-terminale de FliC dans l'induction de cette cytokine dépendante des inflammasomes. De la même manière que pour l'expression des gènes des cytokines de l'inflammasome, la synthèse de l'IL-18 a été abolie suite à l'inhibition de la voie de signalisation NF-κB, montrant que cette voie centrale est impliquée dans la synthèse de l'IL-18 suite à l'activation de l'inflammasome.

Ces résultats vont dans le même sens que les résultats précédant qui montrent que FliC induit l'activation de l'inflammasomes NLRC4, ainsi que l'expression des gènes de la pro-caspase-1 et des cytokines spécifiques des inflammasomes et la synthèse d'IL-18 par les cellules épithéliales. Par ailleurs, l'abolition de l'expression de ces gènes et de la synthèse d'IL-18 après inhibition de la voie NF-κB suggère un rôle pour cette voie dans l'activation de l'inflammasome probablement par l'augmentation du pool (« priming ») de pro-caspase-1 et des pro-cytokines liées à l'inflammasome.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats suggère que la flagelline de *C. difficile* s'intérioriserait dans les cellules épithéliales intestinales et qu'elle active la voie de signalisation des inflammasomes NLRC4 via une interaction entre la région C-terminale de la flagelline et les récepteurs/effecteurs des inflammasomes (NAIP/NLRC4). Cette activation contribuerait à la phosphorylation de NLRC4 sur le résidu Ser533 et à la formation de l'inflammasome NLRC4. Cette phosphorylation de NLRP4 induit le clivage et donc l'activation de la pro-caspase-1 en libérant le peptide p20 et l'activation de la gasdermine D et enfin, la libération de cytokines pro-inflammatoires. La voie de NF- κ B semble jouer un rôle dans la régulation en amont de l'expression des gènes des précurseurs des effecteurs pro-inflammatoires de la pyroptose. En activant l'inflammasome NLRC4 en plus de l'activation du récepteur de la réponse innée TLR4, la flagelline de *C. difficile* contribue à l'amplification de la réponse inflammatoire de l'hôte responsable de la clairance de la bactérie mais également des lésions de la muqueuse intestinale durant l'infection à *C. difficile*.



Article

Clostridioides difficile Flagellin Activates the Intracellular NLRC4 Inflammasome

Hiba Chebly^{1,2}, Jean-Christophe Marvaud¹, Layale Safa², Assem Khalil Elkak², Philippe Hussein Kobeissy³, Imad Kansau¹ and Cécile Larrazet^{1,*}

- ¹ Institut Micalis, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 91400 Orsay, France
² Health Resources and Products Valorization Laboratory, Faculty of Pharmacy, Lebanese University, Beirut 1102-2801, Lebanon
³ Department of Natural Sciences, School of Arts and Sciences, Lebanese American University, Beirut 1102-2801, Lebanon
* Correspondence: cecile.deneve-larrazet@universite-paris-saclay.fr

Abstract: *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), is a major cause of nosocomial diarrhea and colitis. *C. difficile* flagellin FliC contributes toxins to gut inflammation by interacting with the immune Toll-like receptor 5 (TLR5) to activate nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. Flagella of intracellular pathogens can activate the NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) inflammasome pathway. In this study, we assessed whether flagellin of the extracellular bacterium *C. difficile* internalizes into epithelial cells and activates the NLRC4 inflammasome. Confocal microscopy showed internalization of recombinant green fluorescent protein (GFP)-FliC into intestinal Caco-2/TC7 cell line. Full-length GFP-FliC activates NLRC4 in Caco-2/TC7 cells in contrast to truncated GFP-FliC lacking the C-terminal region recognized by the inflammasome. FliC induced cleavage of pro-caspase-1 into two subunits, p20 and p10 as well as gasdermin D (GSDMD), suggesting the caspase-1 and NLRC4 inflammasome activation. In addition, colocalization of GFP-FliC and pro-caspase-1 was observed, indicating the FliC-dependent NLRC4 inflammasome activation. Overexpression of the inflammasome-related interleukin (interleukin (IL)-1 β , IL-18, and IL-33) encoding genes as well as increasing of the IL-18 synthesis was detected after cell stimulation. Inhibition of I-kappa-B kinase alpha (IKK- α) decreased the FliC-dependent inflammasome interleukin gene expression suggesting a role of the NF- κ B pathway in regulating inflammasome. Altogether, these results suggest that FliC internalizes into the Caco-2/TC7 cells and activates the intracellular NLRC4 inflammasome thus contributing to the inflammatory process of *C. difficile* infection.



Citation: Chebly, H.; Marvaud, J.-C.; Safa, L.; Elkak, A.K.; Kobeissy, P.H.; Kansau, I.; Larrazet, C. *Clostridioides difficile* Flagellin Activates the Intracellular NLRC4 Inflammasome. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12366. <https://doi.org/10.3390/ijms232012366>

Academic Editor: Alicja Węgrzyn

Received: 23 September 2022

Accepted: 12 October 2022

Published: 15 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: *Clostridioides difficile*; flagellin; inflammasome; NLRC4; pro-caspase-1; gasdermin; IL-1 β ; IL-18; IL-33

1. Introduction

Clostridioides difficile is an anaerobic, spore-forming, Gram-positive bacterium found in both the environment and intestinal tracts of animals and humans [1]. *C. difficile* infection (CDI) is the leading cause of nosocomial antibiotic-associated diarrhea [2]. Since the past two decades, the emergence of highly virulent and epidemic *C. difficile* strains is associated with several international outbreaks [3]. The bacterium induces a strong intestinal inflammatory response that may lead to the development of pseudomembranous colitis as well as severe complications such as fulminant colitis, toxic megacolon, and colonic perforation. CDI is therefore associated with a high rate of morbi-mortality. The two large clostridial toxins, toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB), have long been considered the main virulence factors of *C. difficile* [4] contributing to the inflammatory lesions observed in patients through the activation of major pro-inflammatory signaling pathways such as MAPK [5], NF- κ B [6] and inflammasome [7].

Other *C. difficile* factors appear to be involved in the pathogenesis, such as the two S-layer proteins (SLP) [8], adhesins [9], hydrolytic enzymes [10], cell wall proteins [11], and flagella [12]. *C. difficile* flagellin FliC, the major component of flagella, plays an essential role in CDI-associated inflammatory response. FliC is recognized by cell surface-associated TLR5, one of the innate immune pattern recognition receptors (PRRs), leading to the activation of MAPK and NF- κ B cell signaling pathways and secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-8 and chemokine (C-C motif) ligand 20—CCL20) [12,13]. We previously showed that the presence of both, toxins and flagella is required for the development of mucosal lesions in a mouse model of CDI [14].

It is still unclear whether *C. difficile* flagellin activates other pro-inflammatory signaling pathways such as the inflammasome one. The inflammasomes play an essential role in connecting the detection of endogenous and microbial danger signals to caspase-1 activation and induction of protective immune responses. In intracellular pathogen bacteria, including *Legionella pneumophila* [15], *Shigella flexneri* [16], *Burkholderia thailandensis* [17], and *Salmonella Typhimurium* [18], flagellins present in the cytosol can also be recognized by NLR, nucleotide oligomerization domain receptors (NOD)-like receptors. Flagellin proteins interact with specific members of the neuronal apoptosis inhibitor protein (NAIP) family, which in turn drive assembly and subsequent activation of the NLRC4 inflammasome [19,20]. Activated inflammasomes recruit a bipartite protein known as apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (ASC) containing a caspase activation and recruitment domains, and drive the proteolytic activation of pro-caspase-1, to caspase-1, and GSDMD activation, resulting in the release of mature, active IL-33, IL-18, and IL-1 β [21] and membrane pores formation (pyroptosis) [22]. Therefore, activation of the inflammasome pathway by *C. difficile* flagella requires the internalization of FliC in the cytosol.

Previous studies showed that different flagellins from Gram-negative bacteria could also be internalized into epithelial cells via TLR5 [23]. We hypothesize that even though *C. difficile* is an extracellular bacterium, FliC could be internalized and activate inflammasomes, thus contributing to the inflammatory process and intestinal damages observed during CDI. In the present study, the internalization of *C. difficile* FliC inside the intestinal epithelial cells was assessed by confocal microscopy. We demonstrated for the first time that FliC is internalized and triggers NLRC4 inflammasome activation, leading to cleavage of pro-caspase-1 and release of inflammasome-related cytokines IL-18 and IL-33.

2. Results

2.1. *C. difficile* Flagellin Is Internalized by the Intestinal Epithelial Cells

Some bacterial factors such as toxins can penetrate the cells and alters their homeostasis. Internalization of *C. difficile* flagella has not yet been studied. To assay flagellin internalization, Caco-2/TC7 cells were incubated with *C. difficile* recombinant flagellin fused in N-terminal with the fluorescent protein GFP (GFP-FliC) or GFP, as a control, in a time-dependent manner. The C-terminal region of FliC, which is involved in inflammasome activation was kept intact. Internalization of *C. difficile* flagellin was assessed by a confocal microscope. The Mean Fluorescence Intensity (MFI) of GFP-FliC was monitored either at the optical z-sections at the apical pole of cells ("TC7-Surface") or the optical middle z-sections corresponding to the inside of cells ("TC7-Intracellular"). Throughout incubation time fluorescence of the GFP control was not detected in any section. The GFP-FliC was mainly localized at the cell surface, following 2 h of incubation (Figure 1a,b). The intracellular MFI of GFP-FliC progressively increased before reaching its maximum at 6 h post-stimulation, while the cell surface signal presented an opposite pattern. (Figure 1b). The GFP-FliC was also observed at the optical middle z-sections at the respective incubation times (Figure 1a,b). These results show that FliC is internalized by the Caco-2/TC7 cells in a time-dependent manner.

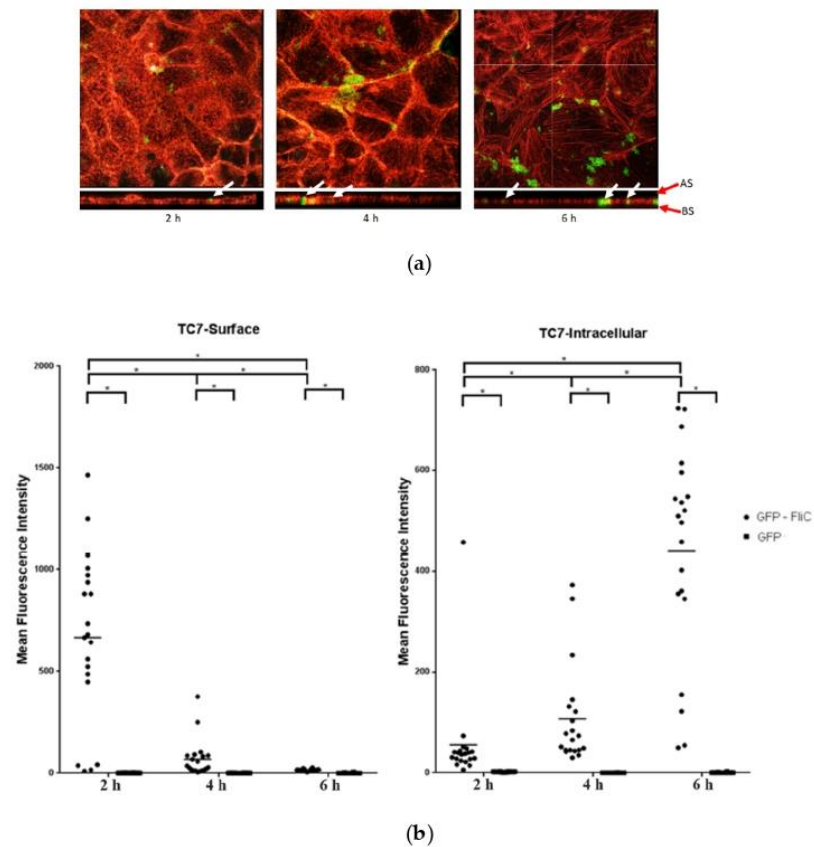


Figure 1. Internalization of the *C. difficile* flagellin in Caco-2/TC7 cells analysis by confocal microscopy. Caco-2/TC7 cells were incubated with the GFP-FliC (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or GFP, as a control, for 2 h, 4 h, and 6 h. (a) Using the Imaris software, we analyzed the profile xz of cells and studied the internalization of GFP-FliC by the epithelial cells. Image acquisition of subsequent sections of transversal planes (from apical surface (AS) to basolateral surface (BS), red arrows) and longitudinal planes of the cells. White arrows point out the GFP-FliC proteins in longitudinal planes. (b) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of GFP-FliC (●) and GFP (■) at the cell surface (TC7-Surface) and inside Caco-2/TC7 cells (TC7-Intracellular). Results represent MFI for 30 representative fields for each time. Horizontal lines represent the mean for each condition. * Statistically significant differences ($p < 0.05$).

2.2. *C. difficile* Flagellin Induces NLRC4 Activation

Flagella of intracellular pathogen induce inflammasome activation through phosphorylation of NLRC4 at Ser533. Internalization of *C. difficile* FliC into cells may therefore activate this same signaling pathway. NLRC4 activation was evaluated in Caco-2/TC7 cells stimulated with either *C. difficile* FliC, from *S. Typhimurium* (FlaST), known to activate NLRC4, or the NLRC4 inflammasome inducer *Bacillus anthracis* lethal factor (LFn)-Needle, as a positive control. The level of phosphorylated NLRC4 was then measured by western blot. As expected, LFn-Needle induced NLRC4 phosphorylation as short as 2 h following stimulation. Cells stimulation with FliC, or FlaST, induced the phosphorylation of NLRC4 in a time-dependent manner with a maximum level of phosphorylated protein observed after 6 h of incubation (Figure 2a,b). These observations were confirmed by using a truncated *C. difficile* flagellin (FliC $\Delta_{286-290}$) with five amino acids removed in the C-terminal part. The mutant protein lacks two leucine residues previously described as being essential for recognition by NAIP [24]. FliC $\Delta_{286-290}$ induced a lower NLRC4 phosphorylation level in stimulated Caco-2/TC7 cells compared to GFP-FliC and the two positive controls FlaST and

LFn-Needle (Figure 2c). These observations indicate that *C. difficile* FliC activates NLRC4 via phosphorylation at Ser553, and this activation requires the presence of the C-terminal part of this flagellin.

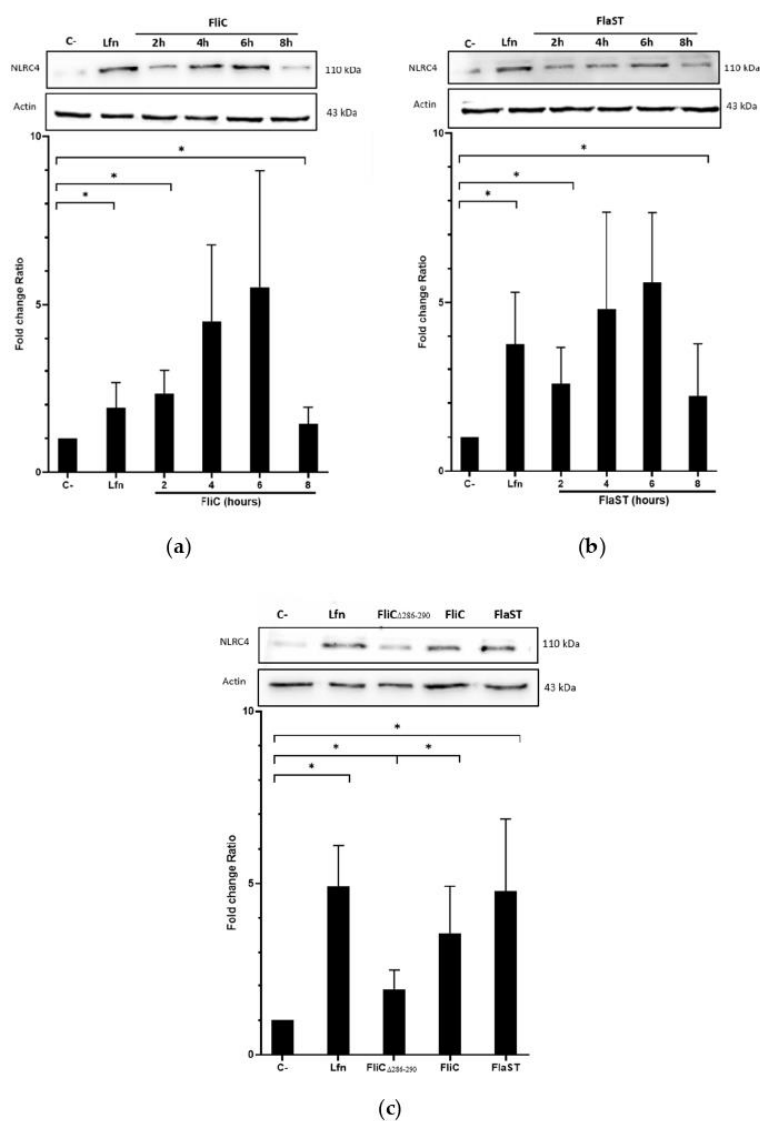


Figure 2. NLRC4 activation by *C. difficile* flagellin. Caco-2/TC7 cells were stimulated with (a) the *C. difficile* FliC (6 µg/mL) or (b) FlaST (2 µg/mL) for 2 h, 4 h, 6 h and 8 h, and a positive control LFn-Needle (150 µg/mL) for 2 h. (c) Cells were stimulated with the *C. difficile* FliC (6 µg/mL), FliC Δ 286-290 (6 µg/mL), FlaST (2 µg/mL) for 4 h, and a positive control LFn-Needle (150 µg/mL) for 2 h. Western Blot was then performed using anti-phosphorylated (Ser553) NLRC4 and anti-actin antibodies. Images are representative of three independent experiments. The density of the bands was measured using Fusion software. Ratios NLRC4/actin were calculated and normalized to a negative control. Results represent the mean ($n = 3$) \pm standard deviations for each condition. * Statistically significant differences ($p < 0.05$).

2.3. *C. difficile* Flagellin Induces Caspase-1 and Gasdermin Activation

Following inflammasome formation and activation, caspase-1 is autoactivated and cleaved into two components p20 and p10. To evaluate whether FliC-mediated NLRC4 activation results in the activation of pro-caspase-1, cells were incubated with FliC or FlaST in a time-dependent manner (2 h, 4 h, 6 h, and 8 h), or with tumor necrosis factor alpha (TNF α) for 1 h as a positive control. The level of p20 protein was then measured by western blot. FliC or FlaST induced an increase in the release of the p20 subunit with a maximum at 4 h and 6 h respectively (Figure 3A,B). To confirm that p20 release is due to caspase-1 activation and subsequent cleavage, cells were treated with VX-756, a specific pro-caspase-1 inhibitor, at different concentrations for 4 h and then stimulated with FliC for 4 h, or with LFn-needle for 2 h, as a positive control. Releasing of p20 was significantly reduced in VX-765-pretreated cells (Figure 3C,D). Similarly, the expression of the *CASP1* gene was increased in Caco-2/TC7 cells following stimulation with FliC (Supplementary Data, Figure S1). These results suggest that the release of p20 induced by *C. difficile* flagellin is mediated by the NLRC4 inflammasome and the subsequent activation of pro-caspase-1.

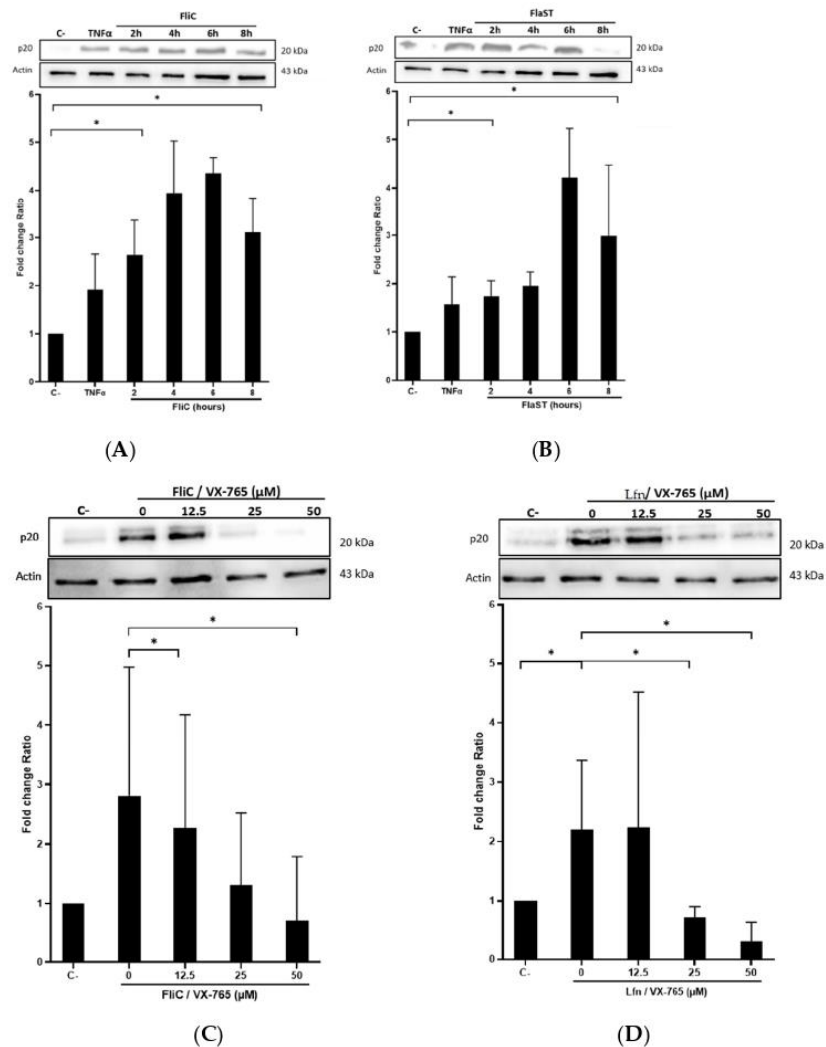


Figure 3. Cont.

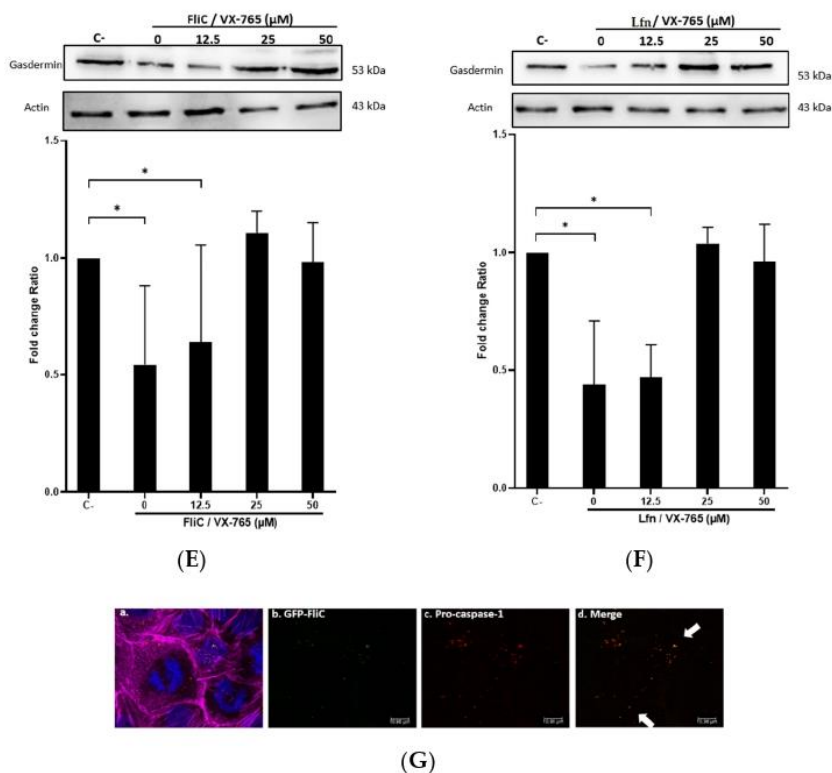


Figure 3. *C. difficile* flagellin induces caspase-1 and GSDMD activation. (A–D) Release of p20 after stimulation of cells with *C. difficile* flagellin. Caco-2/TC7 cells were stimulated with TNF α (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h as a positive control and (A) *C. difficile* FliC (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or (B) FlaST (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h, 4 h, 6 h, and 8 h. Cells were pre-treated, or not, with caspase-1 inhibitor VX-756 (12.5, 25, or 50 μM) for 4 h and then stimulated with (C) *C. difficile* FliC (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 h, or (D) with LFn-Needle (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h, as a positive control. (E–F) GSDMD cleavage by *C. difficile* flagellin. Cells were pretreated, or not, with caspase-1 inhibitor VX-756 (12.5, 25 and 50 μM) during 4 h and then stimulated with FliC (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 h, or a positive control LFn-Needle (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h. After cell stimulations, western blots were then performed using anti-p20 or anti-GSDMD, and anti-actin antibodies. Images are representative of three independent experiments. The density of the bands was measured using Fusion software. Ratios of p20/actin or GSDMD/actin were calculated and normalized to a negative control. Results represent the mean ($n = 3$) \pm standard deviations for each condition. * Statistically significant differences ($p < 0.05$). (G) Colocalization of *C. difficile* flagellin with pro-caspase-1. Cells were incubated with *C. difficile* GFP-FliC (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 h and assessed by immunofluorescence. Cells were labeled for (a) actin (magenta fluorescence excited with 560-nm light) and nuclei (blue fluorescence excited with 360-nm light), (b) FliC in green (green fluorescence excited with 488-nm light), (c) pro-caspase-1 labeled in red with AlexaFluor. (d) Merge between (b) and (c). (Scale bar 10 μm).

Activation of pro-inflammatory caspases can drive pyroptosis by the cleavage of GSDMD, resulting in the assembly of the cleaved GSDMD into the cytoplasmic membrane to form pores. GSDMD activation in the presence or not of the chemical inhibitor of caspase-1 VX-756 was evaluated. Cells were treated or not with different concentrations of VX-756 for 4 h and then stimulated with FliC for 4 h or with LFn-Needle for 2 h, as a positive control. The level of the non-activated form of GSDMD was then measured by western blot. Following FliC stimulation, a decrease in GSDMD level was observed, suggesting a cleavage of this protein (Figure 3E). Pretreatment of cells with VX-756 (at 25 and 50 μM), inhibited GSDMD cleavage following stimulation with either FliC or LFn-Needle (Figure 3F). Colocalization of GFP-FliC with the pro-caspase-1 inside the cells

following 6 h of incubation was observed by confocal microscopy using a specific pro-caspase-1 antibody (Figure 3G). These data suggest that FliC induces the activation of pro-caspase-1 and the cleavage of GSDMD, via NLRC4 inflammasome activation.

2.4. *C. difficile* Flagellin Induces Inflammasome-Related Cytokines Gene Expression

Activation of NLRC4 inflammasome leads to specific cytokines synthesis such as IL-18, IL-33, and IL-1 β . The expression of these cytokine genes in Caco-2/TC7 cells stimulated with FliC, FlaST, or FliC $\Delta_{286-290}$ was measured by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in a time-dependent manner. Upregulation of IL-18, IL-33, and IL-1 β encoding genes was observed in FliC and FlaST-stimulated cells, compared to unstimulated cells (Figure 4). Levels of *IL18* (Figure 4a) and *IL33* gene transcripts (Figure 4b) reached a maximum after 6 h of stimulation with FliC (12-fold and 20-fold, respectively) whereas the expression of *IL1 β* increased more rapidly and reached its highest level (20-fold) after 2 h of stimulation (Figure 4c). Similar gene expression profiles were observed after FlaST stimulation. Finally, FliC $\Delta_{286-290}$ did not induce the expression of the measured genes suggesting that the five amino acids deleted from the C-terminal region of FliC are essential for inflammasome-related cytokines gene expression (Figure 4a–c).

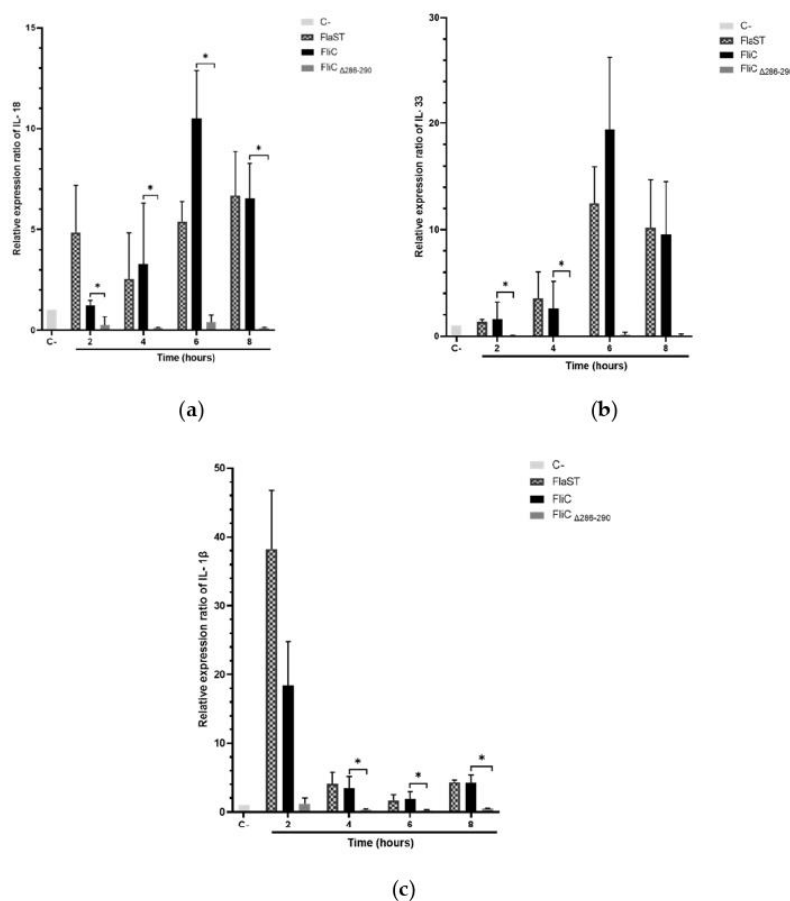
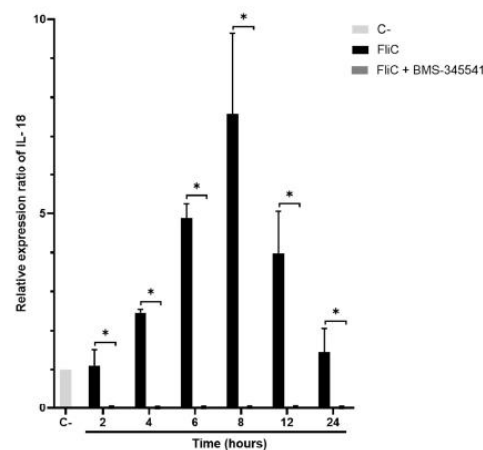


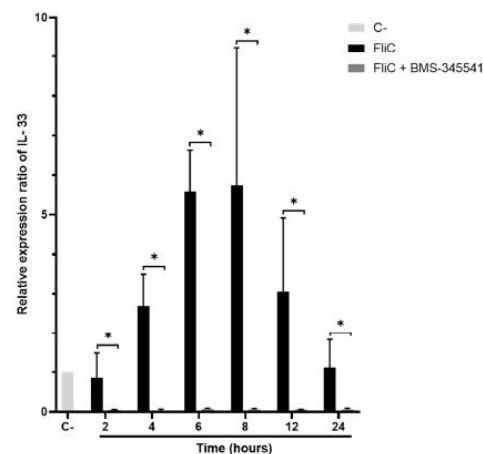
Figure 4. Inflammasome related-cytokines gene expression induced by *C. difficile* flagellin. Caco-2/TC7 cells were stimulated with FliC (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FlaST (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as a positive control, or FliC $\Delta_{286-290}$ (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h, 4 h, 6 h, and 8 h, and monitored for *IL18* (a), *IL33* (b) and *IL1 β* (c) gene expression by qRT-PCR. Results represent the mean ($n = 3$) \pm standard deviations for each condition. * Statistically significant differences ($p < 0.05$).

2.5. NF- κ B Pathway Plays a Role in FliC-Induced Pro-Caspase-1 and Inflammasome-Related Cytokines Gene Expression

The pivot NF- κ B pro-inflammatory signaling pathway plays a key role in inflammasome activity by priming the pro-interleukin and inflammasome effector expressions [25]. This regulation integrates proinflammatory signaling pathways such as those triggered by TLR ligation. NF- κ B, however, prevents excessive inflammation and restrains NLR family CARD domain-containing protein 3 (NLRP3)-inflammasome activation through a poorly defined mechanism [26]. To evaluate the role of NF- κ B in FliC-induced NLRC4 inflammasome activation, IKK α inhibitor BMS-345541 was used, allowing the inhibition of the NF- κ B signaling pathway. Caco-2/TC7 cells were pretreated with the IKK α inhibitor (20 μ M) for 1 h and stimulated with FliC in a time-dependent manner. The expression of pro-caspase-1, IL18, and IL33 genes was then measured by qRT-PCR. As previously shown (Figure 4 and Supplementary Data Figure S1), stimulation with FliC upregulated the expression of pro-caspase-1, IL-18, and IL-33 encoding genes. Inhibition of the NF- κ B signaling completely abolished the expression of these genes (Figure 5). These results suggest that the NF- κ B signaling pathway plays an essential role in the activation of the inflammasome signaling pathway.

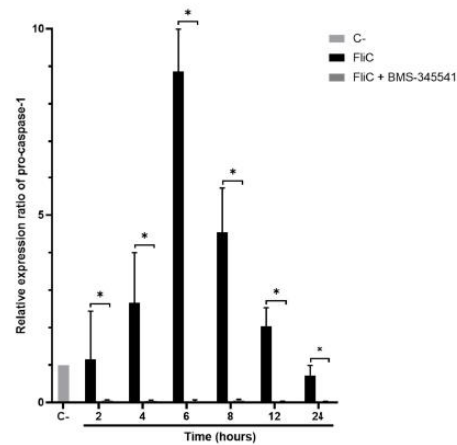


(A)



(B)

Figure 5. Cont.



(C)

Figure 5. Abolition of FliC-induced pro-caspase-1 and inflammasome-related cytokines gene expression following inhibition of NF- κ B signaling pathway. Caco-2/TC7 cells were pre-treated with the IKK α inhibitor BMS-345541 for 1 h, then stimulated with FliC in a time-dependent manner (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, and 24 h) and monitored for *IL18* (A), *IL33* (B) and *CASP1* (C) gene expression by qRT-PCR. Results represent the mean ($n = 3$) \pm standard deviations for each condition. * Statistically significant differences ($p < 0.05$).

2.6. *C. difficile* Flagellin Induces Inflammasome-Related IL-18 Synthesis

Inflammasome-related IL-18 synthesis in cell supernatants was assessed using an ELISA-based method. Caco-2/TC7 cells were stimulated with FliC, FlaST, or FliC $\Delta_{286-290}$ in a time-dependent manner. FliC, as well as FlaST, upregulated IL-18 synthesis following 6 h of stimulation, compared to unstimulated cells (Figure 6). Following cell stimulation with FliC $\Delta_{286-290}$, an important decrease in IL-18 synthesis was observed, confirming the essential role of the C-terminal region of FliC in NLRP4 activation. Inhibition of the NF- κ B signaling pathway using IKK α inhibitor (BMS-345541) abolished IL-18 synthesis in FliC- and FlaST-stimulated cells, suggesting that this pathway is involved in IL-18 synthesis following inflammasome activation.

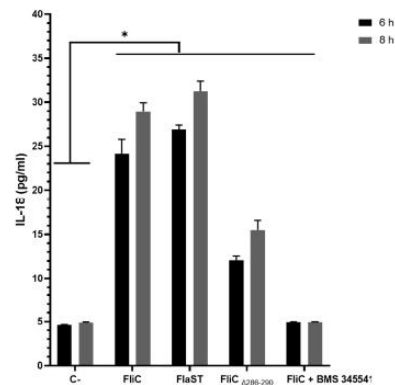


Figure 6. *C. difficile* flagellin induces IL-18 synthesis in Caco-2/TC7-cells. Cells were inhibited for 1 h with a chemical inhibitor of NF- κ B signaling pathway, or not, then incubated with FliC, FlaST, as a positive control, and FliC $\Delta_{286-290}$, for 6 h, or 8 h, and IL-18 was quantified from supernatants. Errors bars indicate the standard error of the mean of three independent experiments. * Statistically significant differences ($p < 0.05$).

3. Discussion

Flagella from enteropathogenic bacteria are involved in the inflammatory host response which could be responsible for intestinal lesions. *C. difficile* is a pathogen known to induce severe inflammatory response involving toxins TcdA and TcdB which have been considered the major virulence factors. Nevertheless, a synergy between the toxins and the flagellin, the main component of the flagella, has been demonstrated in the induction of a strong deleterious innate immune response of the host [14]. The *C. difficile* toxins play a role in opening the tight junctions of the intestinal epithelium thus facilitating the access of the flagellin monomers to the innate immune receptor TLR5 expressed at the basolateral pole of the epithelial cells [27]. We previously reported that this FliC/TLR5 interaction activates the NF- κ B and the MAPK signaling pathways which elicits the synthesis of pro-inflammatory cytokines which amplify the host inflammatory response and mucosal injury [12].

Flagellins from intracellular pathogens induce the formation of an inflammasome when present inside the cell and then trigger an inflammatory immune response which includes pyroptosis (a form of lytic programmed cell death) [28]. This inflammasome involves the NLRC4 protein characterized by its central NOD domain, a regulatory C-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain, and an N-terminal part of variable structure, such as the caspase activation and recruitment domain (CARD) [29]. NAIP in humans (NAIP5 in mice) binds to the D0 domain of flagellins and assembles with NLRC4 to form the multiprotein inflammasome complex, which includes the adaptor protein ASC and the pro-caspase-1, via an interaction CARD-CARD [28]. The inflammasome serves as a platform to cleave pro-caspase-1 to caspase-1 which in turn induces the maturation of the pro-inflammatory IL-18, IL-33, and IL-1 β cytokines, as well as the pore-forming GSDMD [30–32].

However, extracellular flagellin can be internalized by epithelial cells as observed for flagellins of *S. Typhimurium* and *Escherichia coli* strains which are internalized by polarized human Caco-2BBE and T-84 cells. This TLR5-mediated flagellin internalization follows the endosomal-dependent mechanism since flagellins co-localize with endosomal and lysosomal compartments [23]. Moreover, in plant cells, it has been described that the fragment flg22 of bacterial flagellin binds the Flagellin Sensitive 2 (FLS2) receptor and is internalized via the endocytic pathway to induce both local and systemic immune responses [33,34]. In the present study, confocal analyses with a tagged *C. difficile* flagellin demonstrate for the first time that flagellin from an extracellular Gram-positive pathogen can also be internalized by intestinal epithelial cells. The activation of NLRC4 inflammasome by the *C. difficile* FliC was expected since the *C. difficile* FliC shares with other flagellins some of the C-terminal essential amino acids recognized by NAIP5 (Supplementary Data Figure S2) [24,35]. It has to be noticed that in FliC an arginine residue from C-terminus is replaced by glycine, as for the flagellins of the enteropathogen *E. coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), a configuration that seems to induce less NLRC4 activity [36]. Nevertheless, in this study, the internalization of the *C. difficile* FliC induced Ser533 phosphorylation of NLRC4 as previously described for intracellular pathogens. Interestingly, a significant decrease of NLRC4 Ser533 phosphorylation was observed with the truncated FliC $\Delta_{286-290}$ compared to full-length FliC, suggesting that the C-terminal region of the *C. difficile* flagellin is necessary for this phosphorylation. Whether the level of NLRC4 activation induced by FliC is lower than that induced by other flagellins remains to be determined.

The formation of the inflammasome involves the recruitment of pro-caspase-1. Using confocal microscopy, the colocalization of the *C. difficile* flagellin with pro-caspase-1 inside the cell was detected, suggesting an NLRC4 inflammasome assembly. The detection of the activation of pro-caspase-1 by cleavage into subunits p10 and p20 confirmed this inflammasome formation [37]. As previously described for other flagellins, releasing of mature IL-18 by Caco-2/TC7 cells following internalization of FliC, suggest a role for caspase-1 in the maturation of pro-IL-18. Downstream inflammasome activation pathway, the activated caspase-1 elicits the maturation (cleavage) of the GSDMD protein at its N-terminal domain, to form cell membrane pores leading to pyroptosis [38,39]. A structural study showed that

the gasdermin pore is formed by 27 or 28 gasdermin monomers creating a 180 Å inner diameter channel allowing the transport of cytokines and numerous ions [40]. Decreasing the full-length GSDMD level induced by the *C. difficile* FliC strongly suggests a cleavage of this protein and its role in pyroptosis which could contribute to the inflammatory response during *C. difficile* infection.

Transcriptional regulation through NF-κB or interferon regulatory factor (IRF) affects most, if not all, inflammasome molecules from sensors to downstream inflammasome products such as caspase, pro-inflammatory cytokines, and GSDMD. For example, in human monocytes, pro-caspase-4 and pro-caspase-1 gene expressions are regulated by IRF2 [41,42]. Moreover, caspase-11 expression is regulated in the presence of lipopolysaccharide (LPS) or interferon gamma (IFNγ) via the NF-κB signaling pathway [43]. In this study, the observed FliC-induced upregulation of the caspase-1 as the inflammasome-related IL-1β IL-18 and IL-33 cytokine encoding genes was dramatically inhibited by chemical inhibition of NF-κB suggesting a role of NF-κB in the transcriptional expression of inflammasome products following FliC stimulation. In this way, as described for NLRP3 inflammasome [26], NF-κB could play an essential role in the activation of the inflammasome signaling pathway by preparing the pool of pro-caspase-1 and the not constitutively expressed pro-inflammatory inflammasome-related cytokines. Whether NLRP4-FliC inflammasome is similarly subjected to synergy from priming signals has yet to be determined.

Previous reports indicate that intracellular *C. difficile* toxins can activate the NLRP3 inflammasome and trigger IL-1β maturation which contributes to toxin-induced inflammation and intestinal injury [7]. Following the disruption of the epithelial barrier by altering tight junctions [27], the toxins interact with mucosal immune cells to elicit an intense inflammatory response leading to subsequent tissue damage [44,45]. However, the exact mechanism by which the toxin activates the inflammasome remains unknown. Moreover, the *C. difficile* surface layer proteins, forming a crystalline regular array that covers the surface of the bacterium [8], activates inflammasomes and pyroptosis via the ATP-P2X7 pathway which contributes to the inflammatory process and host defense [46].

In conclusion, the present study highlights the role of *C. difficile* flagellin in inflammation by activating the intracellular NLRP4 inflammasome signaling pathway in addition to its already-known role in the activation of the TLR5 pro-inflammatory pathway. In this sense, our results reinforce the idea of the role of *C. difficile* flagella in synergy with toxins in the inflammatory process responsible for lesions of the intestinal mucosa. In contact with epithelial cells, internalized *C. difficile* flagellin stimulates the inflammasome pathway, thus escaping the tolerance of the host's immune system to bacterial flagellins present in the intestinal lumen. Therefore, FliC contributes with toxins and other surface structures to the induction of the inflammatory response of the host by stimulating receptors/sensors of the innate response both on the cell surface and intracellularly. Further studies are necessary to better characterize the internalization mechanisms of FliC inside the intestinal epithelial cells as well as the specific effectors involved in the *C. difficile* FliC stimulated NLRP4 signaling pathway in the context of CDI to better understand the pathogenesis of the bacterium. This study contributes to an improved understanding of *C. difficile* pathogenesis and host immune responses to *C. difficile* infection, which may facilitate the development of new host-targeted therapeutic and successful vaccine strategies.

4. Materials and Methods

Cell culture. Human intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) with L-glutamine (Gibco Laboratories) supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco Laboratories) and 1% non-essential amino acids (Gibco Laboratories). Cells were maintained at 37 °C and 10% CO₂.

Construction of recombinant pET28a-GFP-FliC and pET28a-GFP-FliC₂₈₆₋₂₉₀. The GFP gene and the FliC gene were amplified from the plasmids pCA24N-GFP and pET28a-FliC [12] respectively with specific primers (Table 1) and cloned in the pET28a vector using

the Golden Gate method (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) [47]. The cloning resulted in the fusion of the GFP with the N-terminus of FliC. Briefly, a pET28a vector carrying *BsaI* restriction sites at each side of a spectinomycin gene was mixed with the two amplicons in the presence of *BsaI* and T4 ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), for 1 h at 37 °C. Then *E. coli* TG1 was transformed with the ligation and after selection of the transformants on a kanamycin-containing Luria broth (LB) agar plate, plasmids were extracted and cloning verified by enzymatic digestion. The same procedure was used to create the pET28a-GFP-FliC $\Delta_{286-290}$ with FliC truncated of 15 nucleotides in 3' by amplification with specific primers (Table 1). Each construct was further sequenced for verification.

Table 1. Primers sequences for PCR.

Gene Name	Sequence
<i>GFP</i>	5'-C GGT CTC ATT GCT ATG CCG CCG CAG TAA AGG AG-3' 5'-C GGT CTC ATT TGT ATA GTT CAT CCA TGC CAT G-3'
<i>fliC</i>	5'-C GGT CTC ACA AAA TGA GAG TTA ATA CAA ATG TAA GTG C-3' 5'-C GGT CTC ATG CCG CTC CTA ATA ATT GTA AAA CTC C-3'
<i>fliC</i> $\Delta_{286-290}$	5'-C GGT CTC ACA AAA TGA GAG TTA ATA CAA ATG TAA GTG C-3' 5'-C GGT CTC TTT GCA AAC TCC TTG TGG TTG ATT AGC-3'

Recombinant protein expression and purification. Recombinant proteins GFP-FliC and GFP-FliC $\Delta_{286-290}$ were expressed in the Escherichia coli BL21 strain transformed with the plasmids pET28a-GFP-FliC and pET28a-GFP-FliC $\Delta_{286-290}$ respectively, as described by Tran et al. with some modifications [48]. Each *E. coli* transformant was briefly grown in LB media supplemented with kanamycin at 37 °C for 18 h. The culture was then subcultured at 1:10 (*v/v*) and inoculated at 37 °C until OD600 reached 0.6. Induction was made in the presence of IPTG (1 mM concentration), and protein expression was performed at 16 °C for 18 h. Protein extraction was done by sonication on ice.

Protein purification was performed by affinity chromatography using His-Select Cobalt Affinity Gel (Talon Superflow; Cytiva, Buckinghamshire, UK). After column equilibration with solution A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0), target protein was eluted with solution B (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0). Purified GFP-FliC (or GFP-FliC $\Delta_{286-290}$) samples were loaded on électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE, SDS 12%), and Coomassie Brilliant Blue stained gel confirmed the presence of purified proteins as the expected molecular weight (GFP-FliC: 69 kDa, GFP-FliC $\Delta_{286-290}$: 66 kDa).

Stimulation and treatment cell lines. For inflammasome activation experiments, cells were seeded on 24-well cell culture plates (5×10^5 cells/well) and grown up to 3 days post-confluence. For immunofluorescence experiments, cells were seeded on 24-well cell culture plates (15×10^4 cells/well) and grown up to 60–70% confluence. Cell monolayers were FBS depleted for 4 h before signaling experiments to reduce the phosphorylation background induced by the growth-factor-rich FBS. Cell stimulation with flagellins (recombinant FliC, recombinant GFP-FliC, or recombinant GFP-FliC $\Delta_{286-290}$) was assessed by incubation of cell monolayers with 5 µg/ml of recombinant protein. When indicated, positive controls were obtained by incubating cells with 1.25 µg/ml TNF α (InvivoGen, San Diego, CA, USA) for 15 min or 2 µg/ml ultrapure flagellin from *S. Typhimurium* (FlaST, InvivoGen; San Diego, CA, USA) for 2 h, 4 h, 6 h or 8 h, or 150 µg/ml LFn-Needle (InvivoGen; San Diego, CA, USA) for 2 h, or 5 µg/ml recombinant GFP for immunofluorescence quantification. Inhibition of pro-caspase-1 was obtained by adding 12.5, 25, or 50 µM VX-765 (Caspase-1 inhibitor, InvivoGen, San Diego, CA, USA) to cell monolayers 4 h before stimulation with recombinant proteins [49]. Inhibition of NF- κ B was obtained by adding 20 µM BMS-345541 (IKK α inhibitor; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to cell monolayers 1 h before stimulation with recombinant proteins [50].

SDS-PAGE and Western blot analysis. Cells were washed with sterile PBS-Vanadate (0.5 mM EDTA, 1 mM sodium fluoride, 10 mM hydrogen peroxide, 0.1 mM sodium vanadate, PBS) at 37 °C to remove non-adhering particles, and frozen at −80 °C for at least 15 min. Cells were then lysed by adding lysis buffer (186 mM β-Mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, 10 mM NaF, 25 mM NaPPI, 1 mM Na₃VO₄). Proteins were separated by SDS-PAGE (SDS 10%) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (ThermoScientific, Rockford, IL, USA). For immunoblotting, membranes were washed with TBS (1X Tris-buffered Saline) 0.1% Tween 20, blocked in TBS (0.1% Tween 20, 5% milk), and probed separately overnight with antibodies. According to the manufacturer's instructions, blots were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies (described below), followed by chemiluminescence detection with the ECL Plus kit (Millipore, Billerica, MA, USA). Chemiluminescence signals were detected with a Fusion FX Imaging System (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France), analyzed with Fusion-CAPT software, and normalized with actin.

Primary antibodies used include rabbit polyclonal anti-NLRC4 (NP541; 1:1000, ECM biosciences; Versailles, KY, USA), anti-Caspase-1 (D7F10; 1:1000, Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA), anti-p20 (D57A2; 1:1000, Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA), anti-GSDMDC1 (sc-81868; 1:1000, Santa Cruz Technology; Dallas, TX, USA) or anti-actin (A2066; 1:10000, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Secondary antibodies used include anti-Rabbit IgG (7074; 1:10000, Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA) and anti-Mouse IgG (7076; 1:10000, Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA).

Cytokine assays. After cell stimulations at the indicated time, cell-free culture supernatants were collected and stored at −80 °C until cytokine assays. According to the manufacturer's instructions, human pro-inflammatory cytokine IL-18 production by Caco-2/TC7 cells was quantified using an ELISA-based method using Quantibody Human Inflammation Array 1 from RayBiotech (Norcross, GA, USA).

Quantitative real-time reverse transcription PCR. Total RNA from cell lines was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNA was prepared from 1 µg RNA using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with random primers as described by the manufacturer. qPCR was performed in a 10 µL reaction volume containing 4 ng of cDNA, 5 µL of SSo Advanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France), and 500 nM gene-specific primers. The primers are listed in Table 2. Reactions were run on a CFX96 Real-time System (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) with the following cycling conditions: 30 s polymerase activation at 95 °C and 40 cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 10 s. An additional step from a start at 65 °C to 95 °C (0.5 °C/0.5 s) was performed to establish a melting curve to verify the specificity of the real-time PCR reaction for each primer pair. Results were normalized using the geometric averaging of the reference gene *GAPDH*. Normalized relative ratios were calculated using the $\Delta\Delta$ CT method.

Immunofluorescence assays and quantification. Cells were plated in 24-well culture plates on glass coverslips. After 6 h of incubation with GFP-FliC, cells were washed with 1X PBS (pH 7.2), fixed with 3% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton in PBS. Cells were then washed three times with PBS (pH 7.2), blocked with PBS-gelatin 0.2%, and then incubated with primary antibody rabbit polyclonal caspase-1 (sc-56036, 1:100, Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA) which detects C-terminus of full-length and cleaved caspase-1 for 3 h at RT. After washing with 1X PBS, proteins of interest were detected by incubation for 1 h with fluorescently labeled secondary antibodies AlexaFluor (Abberior Star Red; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 638 goat anti-rabbit IgG (kindly donated by V. Nicolas, PlateForme d'Imagerie Cellulaire—MIPSIT; 1:200), then washed with 1X PBS. Cells were mounted in Prolong™ Gold antifade reagent, containing DAPI staining the nuclear DNA (P36934, Invitrogen Carlsbad, CA, USA). F-actin staining was performed using Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate 560 (P1951, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reagent according to the manufacturer's instructions. Samples were

observed with an inverted g-STED TCS SP8 Leica confocal microscope (Leica, Germany) using an HC PL APO CS2 63 ×/1.40 oil immersion objective lens.

Table 2. Primers sequences for qRT-PCR.

Gene Name	Sequence
<i>hpro-caspase-1</i>	5'-GTT TCT TGG AGA CAT CCC ACA-3' 5'-TGG TGG GCA TCT GCG CTC TAC-3'
<i>hNLRC4</i>	5'- AAT GCA AAG AGG TCA TCG C-3' 5'-AGA GCC TTG CCA AGA GAA GA-3'
<i>hIL-8</i>	5'-GGC ACA AAC TTT CAG AGA CAG-3' 5'-ACA CAG AGC TGC AGA AAT CAG G-3'
<i>hIL-18</i>	5'-AAA GAT GGC TGC TGA ACC AGT-3' 5'-TTT CCT CAG CTG ACA ATG GTG-3'
<i>hIL-33</i>	5'-AGA ACT GGG ATG TAA CTG CCT-3' 5'-CTT TGC TTG CTG TGT TCT TCC-3'
<i>hIL-1β</i>	5'-AAT TTG AGT CTG CCC AGT TCC CC-3' 5'-AGT CAG TTA TAT CCT GGC CGC C-3'
<i>hGAPDH</i>	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3' 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG -3'

For the FliC internalization analysis, taken images are composed of arithmetic stacks of 4–15 deconvoluted images, each 1.2 μm in z-step. Stacks of images (16-bit grayscale) were acquired with a z-step of 0.7 μm with low illumination intensity. GFP protein was used as a negative control for the quantification of the fluorescence intensity. The MFI of GFP and GFP-FliC was determined by measurement of fluorescence in 30 representative fields (at least 100 individual cells), using Leica SP8 acquisition and software analysis (Imaris/ImageJ software). The histogram feature of internalization was used to compare MFI with the control (GFP). The two groups were compared using Mann and Whitney's test performed with Graphpad software. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

Statistical analysis. Results are expressed as means ± sem. Different groups were compared with Mann and Whitney test or Student *t*-test performed by GraphPad Prism software. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232012366/s1>. Reference [36] is cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Performed the experiments and data analysis, drafting the manuscript: H.C. contributed analysis tools, and data analysis, drafting the manuscript: L.S. and A.K.E. contributed reagents/materials/analysis tools, conceived and designed the experiments, data analysis, wrote the manuscript: C.L., J.-C.M., P.H.K. and I.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the French National Research Agency (ANR) as part of the (Investissements d'Avenir) program through the "ADI 2019" project funded by the IDEX Paris-Saclay, ANR-II-IDEX-0003-02 and by The Eiffel scholarship program (Excellence Eiffel_doctorat2019/N° P745276D).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We sincerely thank the technical assistance of Claudine Deloménie (UFR de Pharmacie, ACTAGen-IPSIT) for qRT-PCR analyses and the technical assistance of Valérie Nicolas (UFR de Pharmacie, MIPSIT-IPSIT) for microscopy confocal analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*; Centers for Disease Control and Prevention (U.S.): Atlanta, GA, USA, 2019.
- Martin, J.S.H.; Monaghan, T.M.; Wilcox, M.H. Clostridium Difficile Infection: Epidemiology, Diagnosis and Understanding Transmission. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13*, 206–216. [[CrossRef](#)]
- Shaw, H.A.; Preston, M.D.; Vendrik, K.E.W.; Cairns, M.D.; Browne, H.P.; Stabler, R.A.; Crobach, M.J.T.; Corver, J.; Pituch, H.; Ingebretsen, A.; et al. The Recent Emergence of a Highly Related Virulent Clostridium Difficile Clade with Unique Characteristics. *Clin. Microbiol. Infect.* **2020**, *26*, 492–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kuehne, S.A.; Cartman, S.T.; Heap, J.T.; Kelly, M.L.; Cockayne, A.; Minton, N.P. The Role of Toxin A and Toxin B in Clostridium Difficile Infection. *Nature* **2010**, *467*, 711–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bobo, L.D.; El Feghaly, R.E.; Chen, Y.-S.; Dubberke, E.R.; Han, Z.; Baker, A.H.; Li, J.; Burnham, C.-A.D.; Haslam, D.B. MAPK-Activated Protein Kinase 2 Contributes to Clostridium Difficile-Associated Inflammation. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 713–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hansen, A.; Alston, L.; Tulk, S.E.; Schenck, L.P.; Grassie, M.E.; Alhassan, B.F.; Veermalla, A.T.; Al-Bashir, S.; Gendron, F.-P.; Altier, C.; et al. The P2Y6 Receptor Mediates Clostridium Difficile Toxin-Induced CXCL8/IL-8 Production and Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ng, J.; Hirota, S.A.; Gross, O.; Li, Y.; Ulke-Lemee, A.; Potentier, M.S.; Schenck, L.P.; Vilaysane, A.; Seamone, M.E.; Feng, H.; et al. Clostridium Difficile Toxin-Induced Inflammation and Intestinal Injury Are Mediated by the Inflammasome. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 542–552.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Calabi, E.; Calabi, F.; Phillips, A.D.; Fairweather, N.F. Binding of Clostridium Difficile Surface Layer Proteins to Gastrointestinal Tissues. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5770–5778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Eveillard, M.; Fourel, V.; Bare, M.-C.; Kernéis, S.; Coconnier, M.-H.; Karjalainen, T.; Bourlioux, P.; Servin, A.L. Identification and Characterization of Adhesive Factors of Clostridium Difficile Involved in Adhesion to Human Colonic Enterocyte-like Caco-2 and Mucus-Secreting HT29 Cells in Culture. *Mol. Microbiol.* **1993**, *7*, 371–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Janoir, C.; Péchiné, S.; Grosdidier, C.; Collignon, A. Cwp84, a Surface-Associated Protein of Clostridium Difficile, Is a Cysteine Protease with Degrading Activity on Extracellular Matrix Proteins. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7174–7180. [[CrossRef](#)]
- Waligora, A.-J.; Hennequin, C.; Mullany, P.; Bourlioux, P.; Collignon, A.; Karjalainen, T. Characterization of a Cell Surface Protein of Clostridium Difficile with Adhesive Properties. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 2144–2153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Batah, J.; Deneve-Larrazet, C.; Jolivot, P.-A.; Kuehne, S.; Collignon, A.; Marvaud, J.-C.; Kansau, I. Clostridium Difficile Flagella Predominantly Activate TLR5-Linked NF- κ B Pathway in Epithelial Cells. *Anaerobe* **2016**, *38*, 116–124. [[CrossRef](#)]
- Yoshino, Y.; Kitazawa, T.; Ikeda, M.; Tatsuno, K.; Yanagimoto, S.; Okugawa, S.; Yotsuyanagi, H.; Ota, Y. Clostridium Difficile Flagellin Stimulates Toll-like Receptor 5, and Toxin B Promotes Flagellin-Induced Chemokine Production via TLR5. *Life Sci.* **2013**, *92*, 211–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Batah, J.; Kobeissy, H.; Bui Pham, P.T.; Deneve-Larrazet, C.; Kuehne, S.; Collignon, A.; Janoir-Jouveshomme, C.; Marvaud, J.-C.; Kansau, I. Clostridium Difficile Flagella Induce a Pro-Inflammatory Response in Intestinal Epithelium of Mice in Cooperation with Toxins. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pereira, M.S.F.; Morgantetti, G.F.; Massis, L.M.; Horta, C.V.; Hori, J.I.; Zamboni, D.S. Activation of NLR4 by Flagellated Bacteria Triggers Caspase-1-Dependent and -Independent Responses To Restrict Legionella Pneumophila Replication in Macrophages and In Vivo. *J. I.* **2011**, *187*, 6447–6455. [[CrossRef](#)]
- Suzuki, S.; Franchi, L.; He, Y.; Muñoz-Planillo, R.; Mimuro, H.; Suzuki, T.; Sasakawa, C.; Núñez, G. Shigella Type III Secretion Protein MxiI Is Recognized by Naip2 to Induce Nlr4 Inflammasome Activation Independently of Pkc δ . *PLoS Pathog* **2014**, *10*, e1003926. [[CrossRef](#)]
- Miao, E.A.; Leaf, I.A.; Treuting, P.M.; Mao, D.P.; Dors, M.; Sarkar, A.; Warren, S.E.; Wewers, M.D.; Aderem, A. Caspase-1-Induced Pyroptosis Is an Innate Immune Effector Mechanism against Intracellular Bacteria. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 1136–1142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chen, L.M.; Kaniga, K.; Galán, J.E. Salmonella Spp. Are Cytotoxic for Cultured Macrophages. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 1101–1115. [[CrossRef](#)]
- Zhao, Y.; Yang, J.; Shi, J.; Gong, Y.-N.; Lu, Q.; Xu, H.; Liu, L.; Shao, F. The NLRC4 Inflammasome Receptors for Bacterial Flagellin and Type III Secretion Apparatus. *Nature* **2011**, *477*, 596–600. [[CrossRef](#)]
- Kofoed, E.M.; Vance, R.E. Innate Immune Recognition of Bacterial Ligands by NAIPs Determines Inflammasome Specificity. *Nature* **2011**, *477*, 592–595. [[CrossRef](#)]
- Man, S.M.; Kanneganti, T.-D. Regulation of Inflammasome Activation. *Immunol. Rev.* **2015**, *265*, 6–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aglietti, R.A.; Dueber, E.C. Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends Immunol.* **2017**, *38*, 261–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Eaves-Pyles, T.; Bu, H.-F.; Tan, X.; Cong, Y.; Patel, J.; Davey, R.A.; Strasser, J.E. Luminal-Applied Flagellin Is Internalized by Polarized Intestinal Epithelial Cells and Elicits Immune Responses via the TLR5 Dependent Mechanism. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yang, J.; Zhao, Y.; Li, P.; Yang, Y.; Zhang, E.; Zhong, M.; Li, Y.; Zhou, D.; Cao, Y.; Lu, M.; et al. Sequence Determinants of Specific Pattern-Recognition of Bacterial Ligands by the NAIP-NLRC4 Inflammasome. *Cell Discov.* **2018**, *4*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Schroder, K.; Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* **2010**, *140*, 821–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhong, Z.; Umemura, A.; Sanchez-Lopez, E.; Liang, S.; Shalpour, S.; Wong, J.; He, F.; Boassa, D.; Perkins, G.; Ali, S.R.; et al. NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* **2016**, *164*, 896–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kim, H.; Rhee, S.H.; Pothoulakis, C.; LaMont, J.T. Clostridium Difficile Toxin A Binds Colonocyte Src Causing Dephosphorylation of Focal Adhesion Kinase and Paxillin. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 3336–3344. [[CrossRef](#)]
28. Duncan, J.A.; Canna, S.W. The NLR4 Inflammasome. *Immunol. Rev.* **2018**, *281*, 115–123. [[CrossRef](#)]
29. Lamkanfi, M.; Dixit, V.M. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2012**, *28*, 137–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Abdelaziz, D.H.; Amr, K.; Amer, A.O. Nlr4/Ipaf/CLAN/CARD12: More than a Flagellin Sensor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 789–791. [[CrossRef](#)]
31. Sundaram, B.; Kanneganti, T.-D. Advances in Understanding Activation and Function of the NLR4 Inflammasome. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1048. [[CrossRef](#)]
32. Broz, P.; Newton, K.; Lamkanfi, M.; Mariathasan, S.; Dixit, V.M.; Monack, D.M. Redundant Roles for Inflammasome Receptors NLRP3 and NLR4 in Host Defense against Salmonella. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 1745–1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zipfel, C.; Robatzek, S.; Navarro, L.; Oakeley, E.J.; Jones, J.D.G.; Felix, G.; Boller, T. Bacterial Disease Resistance in Arabidopsis through Flagellin Perception. *Nature* **2004**, *428*, 764–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jelenska, J.; Davern, S.M.; Standaert, R.F.; Mirzadeh, S.; Greenberg, J.T. Flagellin Peptide Flg22 Gains Access to Long-Distance Trafficking in Arabidopsis via Its Receptor, FLS2. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 1769–1783. [[CrossRef](#)]
35. Lightfield, K.L.; Persson, J.; Brubaker, S.W.; Witte, C.E.; von Moltke, J.; Dunipace, E.A.; Henry, T.; Sun, Y.-H.; Cado, D.; Dietrich, W.F.; et al. Critical Function for Naip5 in Inflammasome Activation by a Conserved Carboxy-Terminal Domain of Flagellin. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1171–1178. [[CrossRef](#)]
36. Yang, X.; Yang, F.; Wang, W.; Lin, G.; Hu, Z.; Han, Z.; Qi, Y.; Zhang, L.; Wang, J.; Sui, S.-F.; et al. Structural Basis for Specific Flagellin Recognition by the NLR Protein NAIP5. *Cell Res.* **2018**, *28*, 35–47. [[CrossRef](#)]
37. Makoni, N.J.; Nichols, M.R. The Intricate Biophysical Puzzle of Caspase-1 Activation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2022**, *699*, 108753. [[CrossRef](#)]
38. Kovacs, S.B.; Miao, E.A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 673–684. [[CrossRef](#)]
39. Shi, J.; Gao, W.; Shao, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 245–254. [[CrossRef](#)]
40. Ruan, J.; Xia, S.; Liu, X.; Lieberman, J.; Wu, H. Cryo-EM Structure of the Gasdermin A3 Membrane Pore. *Nature* **2018**, *557*, 62–67. [[CrossRef](#)]
41. Benaoudia, S.; Martin, A.; Puig Gamez, M.; Gay, G.; Lagrange, B.; Cornut, M.; Krasnykov, K.; Claude, J.; Bourgeois, C.F.; Hughes, S.; et al. A Genome-wide Screen Identifies IRF2 as a Key Regulator of Caspase-4 in Human Cells. *EMBO Rep.* **2019**, *20*. [[CrossRef](#)]
42. Cuesta, N.; Nhu, Q.M.; Zudaire, E.; Polumuri, S.; Cuttitta, F.; Vogel, S.N. IFN Regulatory Factor-2 Regulates Macrophage Apoptosis through a STAT1/3- and Caspase-1-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 3602–3611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yoo, L.; Hong, S.; Shin, K.S.; Kang, S.J. PARP-1 Regulates the Expression of Caspase-11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *408*, 489–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Linevsky, J.K.; Pothoulakis, C.; Keates, S.; Warny, M.; Keates, A.C.; Lamont, J.T.; Kelly, C.P. IL-8 Release and Neutrophil Activation by Clostridium Difficile Toxin-Exposed Human Monocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1997**, *273*, G1333–G1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Voth, D.E.; Ballard, J.D. Clostridium Difficile Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 247–263. [[CrossRef](#)]
46. Liu, Y.-H.; Chang, Y.-C.; Chen, L.-K.; Su, P.-A.; Ko, W.-C.; Tsai, Y.-S.; Chen, Y.-H.; Lai, H.-C.; Wu, C.-Y.; Hung, Y.-P.; et al. The ATP-P2X7 Signaling Axis Is an Essential Sentinel for Intracellular Clostridium Difficile Pathogen-Induced Inflammasome Activation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 84. [[CrossRef](#)]
47. Engler, C.; Gruetzner, R.; Kandzia, R.; Marillonnet, S. Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Tran, B.-C.T.; Vo-Nguyen, H.-V.; Nguyen, V.-A.; Tran, T.L.; Tran-Van, H. FliC-Delta220-320 from Salmonella Enteritidis as an Adjuvant for Vaccine Development. *SSR-II/LS* **2020**, *6*, 2494–2501. [[CrossRef](#)]
49. Stack, J.H.; Beaumont, K.; Larsen, P.D.; Straley, K.S.; Henkel, G.W.; Randle, J.C.R.; Hoffman, H.M. IL-Converting Enzyme/Caspase-1 Inhibitor VX-765 Blocks the Hypersensitive Response to an Inflammatory Stimulus in Monocytes from Familial Cold Autoinflammatory Syndrome Patients. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 2630–2634. [[CrossRef](#)]
50. Burke, J.R.; Pattoli, M.A.; Gregor, K.R.; Brassil, P.J.; MacMaster, J.F.; McIntyre, K.W.; Yang, X.; Iotzova, V.S.; Clarke, W.; Strnad, J.; et al. BMS-345541 Is a Highly Selective Inhibitor of I κ B Kinase That Binds at an Allosteric Site of the Enzyme and Blocks NF- κ B-Dependent Transcription in Mice. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1450–1456. [[CrossRef](#)]

Discussion

Discussion

C. difficile est un agent pathogène connu pour induire une importante réponse inflammatoire pouvant aboutir à des lésions sévères de la muqueuse intestinale. Les toxines TcdA et TcdB, produites par la bactérie durant l'infection, ont été largement considérées comme les principaux facteurs de virulence responsables de ces lésions. Néanmoins, d'autres facteurs de la bactérie ont été décrits ces dernières années comme ayant un rôle dans la pathogénicité, suggérant que les toxines à elles seules ne sont pas suffisantes pour expliquer les lésions de la muqueuse développées durant l'infection [376]. Les flagelles des bactéries pathogènes sont impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte, qui est responsable de la clairance bactérienne mais également des lésions tissulaires. La première preuve mettant en évidence le rôle de la flagelline (composant structural majeur des flagelles) de *C. difficile* dans l'activation du récepteur de l'immunité innée TLR5 a été rapportée par Yoshino et al. (2013), qui ont montré, dans des modèles de cellules épithéliales intestinales HT29 et Caco-2, que la flagelline native, extraite d'une souche clinique de *C. difficile*, activait les voies de signalisation pro-inflammatoires de NF- κ B et de la MAPK p38 [219]. De même, des travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont montré, dans deux modèles cellulaires Caco-2 et MDCK exprimant le TLR5 humain, que la flagelline de *C. difficile* pouvait non seulement induire les voies de NF- κ B et de p38, mais également celles des MAPKs ERK1/2 et JNK, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires Il-8, TNF α , IL-6, MCP-1 entre autres, avec un rôle prédominant de la voie centrale de NF- κ B [291,398]. Cela a été confirmé *in vivo* dans un modèle murin d'ICD, par l'absence de manifestations cliniques chez les souris infectées par une souche mutante dépourvue de FliC, ainsi que chez des souris n'exprimant pas le TLR5 (KO *tlr5*^{-/-}) et infectées par la souche sauvage flagellée R20291, suggérant ainsi le rôle essentiel des flagelles de *C. difficile* par le biais de son interaction avec TLR5, dans l'induction et l'amplification de la réponse inflammatoire intestinale [291,398]. Les auteurs de ces études émettent l'hypothèse selon laquelle les toxines TcdA et TcdB, exerçant leur effet cytotoxique sur les cellules épithéliales intestinales, perturbent l'intégrité des jonctions serrées épithéliales, ce qui pourrait faciliter l'accès des monomères de flagelline au récepteur TLR5 exprimé au pôle basolatéral des cellules épithéliales intestinales [720].

Les flagellines des bactéries à Gram négatif pathogènes, telles que *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella Typhimurium*, sont reconnues par les récepteurs de type NOD (NLR) caractérisés par leur domaine central de liaison et d'oligomérisation des nucléotides (NOD), un domaine de régulation C-terminal riche

en leucine (LRR) et une partie N-terminale de structure variable, comme le domaine d'activation et de recrutement des caspases (CARD) [721]. Le récepteur NLRC4 (connu également sous le nom IPAF, CARD12 ou CLAN) de type NOD, identifié en 2001, s'oligomérisise et forme des complexes multiprotéiques, connus sous le nom d'inflammasomes, en réponse aux flagelles bactériens et au système de sécrétion T3SS de *Salmonella Typhimurium* [538]. Les membres de la famille NAIP (famille NLR, protéine inhibitrice de l'apoptose) ont ensuite été identifiés comme étant des senseurs de l'inflammasome NLRC4 [570,722,723]. NAIP reconnaît la protéine aiguille du système de sécrétion de Type III de *S. Typhimurium* et les sous-unités « aiguille » homologues retrouvées chez *Chromobacterium violaceum*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis*, et *E. coli* entérohémorragique [570,722,723]. NAIP se lie au domaine D0 de la flagelline, s'assemble avec NLRC4 pour former le complexe multiprotéique appelé inflammasome, qui comprend la protéine adaptatrice ASC et la pro-caspase-1, via une interaction CARD-CARD. L'inflammasome sert alors de plateforme pour cliver la pro-caspase-1 en caspase-1 qui, à son tour, induit la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-18, IL-33 et IL-1 β , ainsi que de la Gasdermin D, pour la formation des pores dans la membrane plasmique conduisant à la pyroptose, ou mort inflammatoire programmée [570,722,723].

Les flagellines extracellulaires peuvent être internalisées par les cellules épithéliales. En effet, il a été montré que les flagellines des souches de *S. Typhimurium* et de *E. coli* sont internalisées par les cellules humaines polarisées Caco-2BBE et T-84, dans un mécanisme dépendant de TLR5, et co-localisent avec les compartiments endosomaux et lysosomaux [724]. De plus, dans les cellules végétales, il a été décrit qu'un fragment de flagelline bactérienne nommé Flg22 se lie au récepteur *Flagellin Sensitive 2* (FLS2) et, après internalisation par un mécanisme d'endocytose, induit des réponses immunitaires locales et systémiques [725,726]. Dans ce travail de recherche, nous avons démontré pour la première fois, par microscopie confocale, que la flagelline d'un agent pathogène extracellulaire à Gram positif peut également être internalisée dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2/TC7, phénomène qui peut se produire au cours de l'infection intestinale par *C. difficile*. En effet, après colonisation de la surface épithéliale, les monomères de flagelline libérés à proximité des cellules épithéliales peuvent atteindre la surface épithéliale et être ensuite internalisés et détectés par les molécules senseur des inflammasomes NAIP/NLRP4, ligands spécifiques des flagellines et des peptides de l'appareil de sécrétion de type III bactériens. Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas exploré la voie d'internalisation empruntée par la flagelline FliC de *C. difficile* dans les cellules

épithéliales Caco-2/TC7. Il est possible que FliC soit endocytée par la voie d'endocytose utilisée par le TLR5, exprimé même faiblement au pôle apical des cellules épithéliales, comme c'est le cas des flagellines de *Salmonella* et d'*E. coli* O83:H1 [724]. Des études complémentaires sont nécessaires pour élucider le rôle du récepteur TLR5 dans l'internalisation de FliC et mieux caractériser les mécanismes d'internalisation de FliC et son devenir à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales [727,728].

Le fait que FliC partage dans sa région C-terminale les acides aminés essentiels à l'interaction avec NLRC4 rendait l'activation de l'inflammasome NLRC4 par FliC prévisible. Les résultats de notre étude montrent en effet que FliC induit la phosphorylation du résidu Ser533 de NLRC4, modification post-traductionnelle nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRC4 précédemment décrite pour les flagellines de bactéries pathogènes intracellulaires. De manière intéressante, une diminution significative de la phosphorylation de NLRC4 a été observée avec la protéine recombinante FliC Δ 286-290, tronquée dépourvue des acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'inflammasome, par rapport au niveau de phosphorylation obtenu par FliC, suggérant que FliC peut interagir par sa région C-terminale directement avec le domaine LRR de NLRC4, contribuant ainsi à sa phosphorylation [534,535]. L'activation et la conséquence oligomérisation de NLRC4 peuvent suffire à la formation de l'inflammasome. Néanmoins, NAIP, ligand également des flagellines par son domaine LRR, pourrait s'associer à l'inflammasome NLRP4 pour constituer la plateforme de signalisation de l'inflammasome, comme cela a été montré pour des isomères murins de NAIP [519,528,729]. Le rôle de NAIP humain dans la formation de l'inflammasome NLRP4 induit par la flagelline de *C. difficile* reste à démontrer.

FliC, ayant emprunté la voie de l'endocytose via le TLR5, aurait pu être dégradée comme les flagellines de bactéries commensales qui ne provoquent pas une réponse immunitaire à grande échelle et sans restriction et ainsi ne pas stimuler les voies des inflammasomes, ce qui entrainerait le maintien de l'homéostasie intestinale. Cependant, les bactéries pathogènes de l'intestin ont développé des mécanismes évolués (par exemple, système de sécrétion de type III, exotoxines, endotoxines, utilisation de protéines de l'hôte comme récepteurs, protéines effectrices bactériennes qui manipulent la cellule hôte) qui leur permettent de contourner les défenses de l'hôte, de se déplacer à travers la couche de mucus et d'accéder aux cellules épithéliales intestinales.

La formation des inflammasomes NLRC4 par interaction entre NLRC4 et la flagelline de *C. difficile* a été analysée en utilisant la microscopie confocale. Alors qu'une phosphorylation activatrice de NLRP4 a pu être mise en évidence par immunoblot, nous n'avons pas pu montrer de colocalisation de la protéine recombinante GFP-FliC avec NLRP4, les anticorps dirigés contre cette dernière protéine s'étant avérés inefficaces pour le marquage de la protéine. En revanche, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la caspase-1, nous avons pu mettre en évidence une colocalisation entre GFP-FliC et la caspase-1 dans le cytoplasme des cellules Caco-2/TC7, suggérant la formation du complexe moléculaire de l'inflammasome NLRC4 avec FliC. La détection de l'activation de la pro-caspase-1 par clivage en sous-unités p10 et p20 [730], ainsi que l'augmentation des concentrations d'IL-18 dans le surnageant des cellules Caco-2/TC7 suite à l'internalisation de FliC confirme ce résultat, et va dans le sens du rôle de la caspase-1 dans la maturation de la pro-IL-18.

L'interaction des flagellines bactériennes avec l'inflammasome NLRC4 sert de plateforme pour le clivage en N-terminal de la GSDMD par la caspase-1, pour former des pores dans la membrane cellulaire, conduisant à la pyroptose [570,723,731]. Une étude structurale a montré que le pore de GSDMD est formé par 27 ou 28 monomères de gasdermine, créant un canal de 180 Å de diamètre interne et permettant le transport de cytokines et de nombreux ions [732]. Nos résultats confirment que la flagelline de *C. difficile* reconnue par NLRC4 contribue à la formation de l'inflammasome NLRC4 avec l'interaction avec la pro-caspase-1, laquelle subit un clivage en deux sous-unités p20 et p10, pour ensuite activer la GSDMD. De plus, nous avons démontré qu'à la suite de l'internalisation de FliC une diminution du taux de la forme entière de GSDMD est observée, suggérant son clivage et donc son rôle dans la pyroptose. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à visualiser par microscopie confocale la localisation de la GSDMD activée et polymérisée au niveau de la membrane cellulaire à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la forme activée de la GSDMD. Cependant, comme indiqué, la détection de l'IL-18 dans le surnageant des cellules stimulées par FliC atteste du phénomène de relargage de la forme active de cette cytokine vers le milieu extracellulaire, même si une corrélation entre la cinétique de relargage de l'IL-18 et la mort cellulaire n'a pas été déterminée. Des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre la cinétique de relargage des cytokines spécifiques des inflammasomes et celle de la mort cellulaire par pyroptose et ainsi mieux définir le rôle de la GSDMD dans ces deux phénomènes.

Des études *in vitro* utilisant des macrophages dérivés de la moelle osseuse ont révélé que l'inflammasome NLRC4 médiait la production d'IL-1 β et d'IL-18 actifs en réponse à *S.*

Typhimurium et *L. pneumophila* [533,549]. En corrélation avec ces données, nous avons démontré une surexpression des gènes codant l'IL-1 β , l'IL-18 et l'IL-33 lors de la stimulation des cellules par FliC, contrairement aux cellules stimulées par FliC Δ 286-290 tronquée, laquelle s'est avérée également incapable de stimuler l'inflammasome NLRC4 (Figure 4 de l'article publié). Bien que FliC induise également une surexpression du gène de l'IL-1 β , sa cinétique d'expression est très précoce, comparée à celle des autres gènes de cytokines. Cette augmentation précoce aurait pu être attribuée à l'induction de la voie de signalisation TLR5. Cependant, dans notre modèle de cellules Caco-2/TC7, FliC Δ 286-290 tronquée, qui conserve le domaine d'activation du TLR5 (et dont l'activité d'induction d'IL-8 a été confirmée au laboratoire), n'a pas induit la surexpression du gène de l'IL-1 β , ni ceux des autres cytokines de l'inflammasome comme indiqué plus haut, suggérant que l'induction de ces gènes est directement associée à l'activité de l'inflammasome de manière indépendante du priming induit par l'activation de TLR5. Néanmoins, dans le contexte de l'infection de la muqueuse, la réponse cellulaire face aux agressions doit être rapide pour permettre la synthèse de précurseurs pro-inflammatoires faiblement présents de manière constitutive. C'est ainsi que le rôle de NF- κ B dans la régulation de la transcription des gènes clés semble essentiel à la régulation de cette réponse aux agressions par des pathogènes. En effet, la régulation transcriptionnelle affecte les effecteurs de l'inflammasome et a un impact majeur sur ces voies de signalisation [529,684,686,733]. L'un des aspects clés de cette régulation de la transcription est la régulation de l'accès de l'enzyme Pol II et des facteurs de transcription à l'ADN, dont NF- κ B [734]. De nombreuses protéines CARD, comme NOD1, NOD2 et ASC, participent aux voies de signalisation NF- κ B associées aux réponses immunitaires pour l'induction de la transcription des pro-interleukines [675,735,736]. Ainsi, par exemple dans les monocytes humains, l'expression de la pro-caspase-11 montre une forte régulation à la hausse en présence de LPS ou d'IFN- γ , ce qui favorise le recrutement de NF- κ B [737,738], et l'expression de la pro-caspase-1 est régulée par IRF2 [690]. Dans ce contexte, l'expression de l'IL-18 dans les monocytes humains est inductible par la stimulation du LPS d'une manière dépendante de JAK/STAT. La transcription de l'IL-1 β induite par le LPS résulte donc de la coopération intime de NF- κ B, dépendant du signal, avec les facteurs de transcription pionniers C/EBP β et PU.1 [737,738]. Au cours de notre étude, nous avons cherché à élucider le rôle de NF- κ B dans la voie de signalisation de l'inflammasome induite par FliC, et nous avons pu observer l'impact majeur de la régulation par NF- κ B des gènes *CASP1* ainsi que des gènes des cytokines *IL1 β* , *IL18* et *IL33* liés à l'inflammasome. En effet, l'inhibition chimique de NF- κ B a considérablement réduit la surexpression de ces gènes à la suite de la stimulation par FliC,

suggérant un rôle majeur de NF- κ B dans l'expression transcriptionnelle des produits de l'inflammasome. De cette façon, comme décrit pour l'inflammasome NLRP3, NF- κ B préparerait le pool de pro-caspase-1 et des précurseurs de cytokines liées à l'inflammasome, qui ne sont pas exprimées de façon constitutive ou exprimées faiblement dans les cellules quiescentes. Il serait intéressant de déterminer si l'inflammasome NLRP4 induit par FliC est soumis de manière similaire à la synergie des signaux d'amorçage observés pour NLRP3. Dans le contexte de notre étude, FliC $_{\Delta 286-290}$ tronquée, alors qu'elle conserve son activité de ligand de TLR5, n'a pas induit l'expression de ces gènes, suggérant que l'implication de NF- κ B peut avoir lieu par l'activation directe de l'inflammasome et non pas par un « priming » provoqué par l'activation de TLR5. La protéine adaptatrice ASC, connue pour son rôle dans l'activation de NF- κ B et de l'apoptose via l'activation des inflammasomes NLRC4 par le biais de la caspase-8, pourrait favoriser l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires [648,675]. En effet, l'oligomérisation d'ASC induit l'apoptose à la suite de l'activation, à la fois des caspases et de NF- κ B. Ainsi, l'activation de TLR5 par FliC ne serait peut-être pas nécessaire ou essentielle pour préparer le pool de pro-caspase 1 et de précurseurs des cytokines pro-inflammatoires liés à l'inflammasome NLRC4. D'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser les effecteurs spécifiques de l'inflammasome induit par FliC, et notamment pour élucider le rôle de l'adaptateur ASC ou d'autres molécules dans l'activation directe de la voie de signalisation de NF- κ B nécessaire à la mise en place d'une réponse rapide de la cellule à la suite de la stimulation par la flagelline FliC de *C. difficile*.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Notre étude met en évidence un nouveau rôle de la flagelline de *C. difficile* dans l'inflammation, en activant non seulement la voie de signalisation TLR5 [291,398], mais également celle de l'inflammasome NLRC4, après son internalisation dans un modèle de cellules épithéliales intestinales. Nos résultats renforcent le rôle des flagelles de *C. difficile* en synergie avec les toxines dans le processus inflammatoire responsable des lésions de la muqueuse intestinale. Au contact des cellules épithéliales, les monomères de flagelline de *C. difficile* internalisés stimuleraient la voie de l'inflammasome, échappant ainsi à la tolérance du système immunitaire de l'hôte aux flagellines bactériennes présentes dans la lumière intestinale.

L'ensemble des données collectées au cours de nos recherches nous permettent de proposer un modèle sur le rôle conjoint des toxines et des flagelles de *C. difficile* dans la réponse immunitaire inflammatoire de l'hôte au cours des ICDs (Figure 17). Selon ce modèle, après l'action des toxines sur le cytosquelette provoquant des perturbations des jonctions serrées et altérant la perméabilité épithéliale, les monomères de flagelline, relargués à proximité, atteindraient le récepteur de surface TLR5 qui reconnaît la flagelline avec deux conséquences possibles : 1) l'activation directe de la voie de signalisation de la réponse innée, aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, TNF α , responsables de la migration de polynucléaires et de monocytes/macrophages vers la muqueuse ; 2) l'internalisation de la flagelline par la voie endocytaire, avec la reconnaissance de la flagelline par le récepteur/senseur intracellulaire NLRC4 et la conséquente activation des inflammasomes, conduisant à la pyroptose cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 et IL-33.

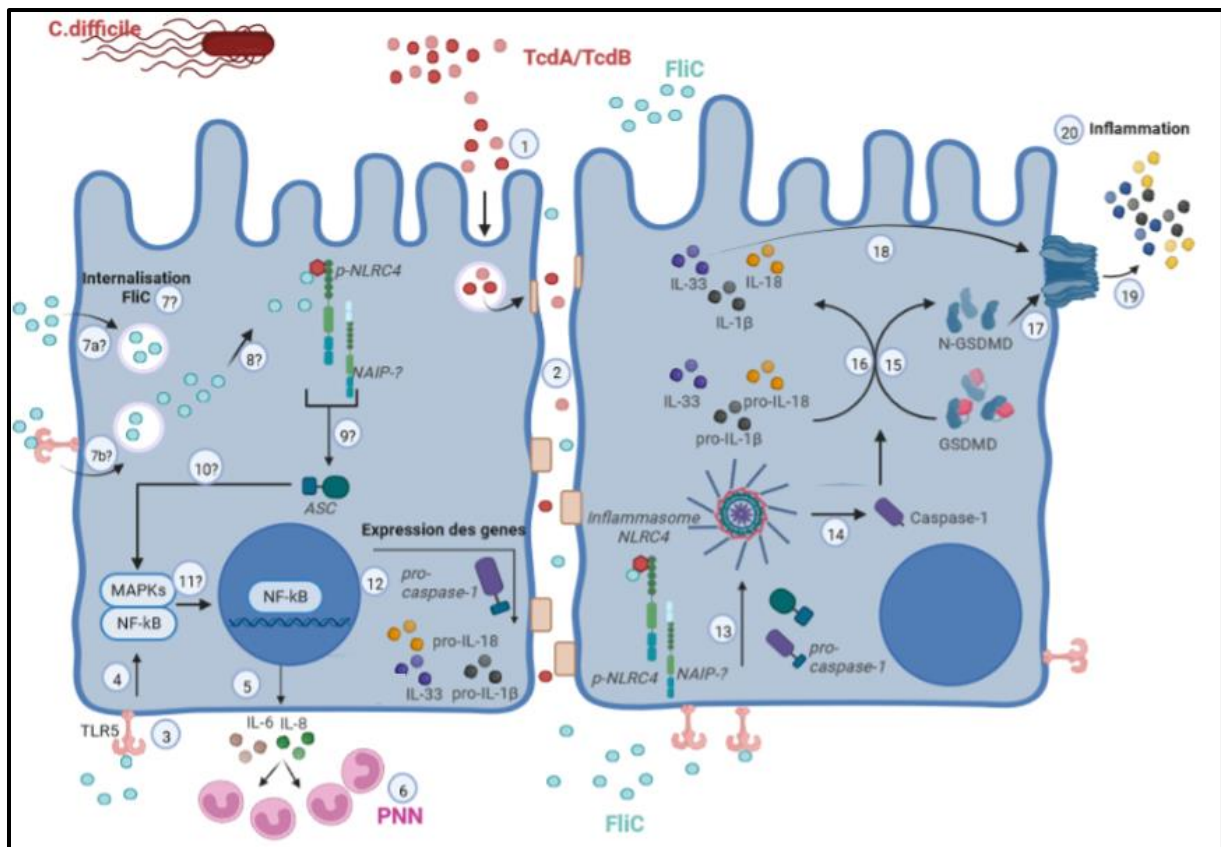


Figure 21. Modèle d'action synergique des toxines TcdA et TcdB et des flagelles de *C. difficile*. (1) Les toxines TcdA et TcdB exercent leur effet cytotoxique sur les cellules épithéliales perturbant l'intégrité des jonctions serrées épithéliales. (2) Les monomères de flagelline (FliC) peuvent alors atteindre les récepteurs TLR5 (3) exposés à la surface cellulaire, lesquels (4) vont activer des voies de signalisation NF-κB et MAPKs, (5) aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et IL-6) et (6) au recrutement de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans la muqueuse. (7) FliC peut être internalisée à l'intérieur des cellules intestinales épithéliales (mécanisme inconnu), soit (7a) par endocytose, soit (7b) via le récepteur TLR5. (8) Elle interagit avec NLRC4/NAIP, conduisant à la phosphorylation de NLRC4 (p-NLRC4) et (9) à l'activation de l'adaptateur ASC. La voie de signalisation de NF-κB est activée, soit suite à (10) une interaction de TLR5 avec FliC, soit (11) via ASC. (12) Cette activation conduit à la préparation du pool des gènes de la pro-caspase-1 et des cytokines spécifiques des inflammasomes (IL-18, IL-33 et IL-1β). (13) NAIP/p-NLRC4, reconnu par FliC, s'assemblent avec ASC et la pro-caspase-1 pour former l'inflammasome NLRC4. (14) Ce complexe multimoléculaire conduit à l'activation de la caspase-1, qui à son tour clive la GSDMD en N-terminal (15), contribuant à la formation des pores membranaires et à la pyroptose cellulaire (17). De plus, la caspase-1 active (16) les pro-cytokines inflammatoires IL-18, IL-33 et IL-1β (18) qui sont libérées vers l'extérieur des cellules au travers des pores formés (19), contribuant au processus inflammatoire de la muqueuse (20). D'après Batah et al., Chebly et al.

Jusqu'à récemment, il était admis que seules les toxines TcdA et TcdB étaient responsables de la pathogénie de la bactérie et des lésions de la muqueuse intestinale observées au cours des infections à *C. difficile*. Cependant, l'ensemble de travaux récents, y compris celui-ci, montre que, même si la production des toxines est essentielle au développement de la maladie (les souches non toxigènes semblent incapables d'induire des ICD), d'autres facteurs de la surface de la bactérie (couche S, peptidoglycane, flagelles) contribuent à la dérégulation de la réponse innée par le biais notamment de la stimulation des TLRs exposés à la surface épithéliale. La démonstration de l'activation par les flagelles de *C. difficile* de deux PRR

différents de l'hôte, le TLR5 et l'inflammasome NLRC4, constitue l'un des aspects les plus originaux de notre travail et apporte de nouveaux éléments à la compréhension de la physiopathologie de l'ICD. Ainsi, le système immunitaire élaboré et complexe de l'hôte permet de détecter les envahisseurs dangereux, et leurs produits, le plus tôt possible afin de commencer la lutte contre ces facteurs nocifs, avant qu'ils n'accèdent à la lamina propria. En échappant au phénomène de tolérance et d'homéostasie de la muqueuse, la flagelline amplifie la réponse innée de l'hôte, laquelle dépasserait la fonction principale de clairance du pathogène et d'homéostasie, provoquant ainsi des effets délétères au niveau de la muqueuse intestinale à l'origine d'une grande partie des manifestations cliniques observées lors des ICDs.

Ces travaux de recherche ont mis en évidence l'activation d'une voie pro-inflammatoire importante, celle de l'inflammasome NLRC4, dans le cadre de l'infection à *C. difficile*, avec l'identification de certains des effecteurs impliqués. Cependant, des études plus précises sur l'ensemble des effecteurs de cette voie de signalisation, tant *in vitro* qu'*in vivo*, permettront d'acquérir une meilleure connaissance du rôle de ces effecteurs et de leurs mécanismes précis de régulation dans le contexte de l'ICD. Ces études contribueront à l'identification des nouvelles cibles thérapeutiques chez l'hôte, afin de tenter de contrôler plus spécifiquement les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et les lésions tissulaires qui en résultent.

Enfin, ces données renforcent le fait que les flagellines bactériennes pourraient constituer un immunogène efficace pour l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre des pathogènes intestinaux. En ce qui concerne l'ICD, ces données ouvrent la voie à d'autres approches thérapeutiques ciblées et vaccinales, en complément des approches utilisant les toxines TcdA ou TcdB comme seuls immunogènes et dont l'efficacité en termes de protection s'est révélée jusqu'à présent incomplète.

Remerciements

Nous remercions sincèrement l'assistance technique de Claudine Deloménie (UFR de Pharmacie, ACTA Gen-IPSIT) pour les analyses qRT-PCR et l'assistance technique de Valérie Nicolas (UFR de Pharmacie, MIPSIT-IPSIT) pour les analyses confocales en microscopie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Didelot, X.; Eyre, D.W.; Cule, M.; Ip, C.L.; Ansari, M.; Griffiths, D.; Vaughan, A.; O'Connor, L.; Golubchik, T.; Batty, E.M.; et al. Microevolutionary Analysis of *Clostridium Difficile* Genomes to Investigate Transmission. *Genome Biol* **2012**, *13*, R118, doi:10.1186/gb-2012-13-12-r118.
2. Rikki, K. *Microbiology Atlas*. Disponible Sur : <https://www.microbiologyinpictures.com/index.php>; 2019.
3. Edwards, A.N.; Karim, S.T.; Pascual, R.A.; Jowhar, L.M.; Anderson, S.E.; McBride, S.M. Chemical and Stress Resistances of *Clostridium Difficile* Spores and Vegetative Cells. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01698.
4. Smits, W.K.; Lyras, D.; Lacy, D.B.; Wilcox, M.H.; Kuijper, E.J. *Clostridium Difficile* Infection. *Nat Rev Dis Primers* **2016**, *2*, 16020, doi:10.1038/nrdp.2016.20.
5. Hall, I.C. INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS: WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE, BACILLUS DIFFICILIS. *Am J Dis Child* **1935**, *49*, 390, doi:10.1001/archpedi.1935.01970020105010.
6. Czepiel, J.; Drózdź, M.; Pituch, H.; Kuijper, E.J.; Perucki, W.; Mielimonka, A.; Goldman, S.; Wultańska, D.; Garlicki, A.; Biesiada, G. *Clostridium Difficile* Infection: Review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2019**, *38*, 1211–1221, doi:10.1007/s10096-019-03539-6.
7. Lance George, W.; Goldstein, EllieJ.C.; Sutter, VeraL.; Ludwig, ShellyL.; Finegold, SydneyM. ÆTIOLOGY OF ANTIMICROBIAL-AGENT-ASSOCIATED COLITIS. *The Lancet* **1978**, *311*, 802–803, doi:10.1016/S0140-6736(78)93001-5.
8. Larson, H.E.; Price, A.B.; Honour, P.; Borriello, S.P. CLOSTRIDIUM DIFFICILE AND THE ÆTIOLOGY OF PSEUDOMEMBRANOUS COLITIS. *The Lancet* **1978**, *311*, 1063–1066, doi:10.1016/S0140-6736(78)90912-1.
9. Keighley, M.R.; Burdon, D.W.; Arabi, Y.; Williams, J.A.; Thompson, H.; Youngs, D.; Johnson, M.; Bentley, S.; George, R.H.; Mogg, G.A. Randomised Controlled Trial of Vancomycin for Pseudomembranous Colitis and Postoperative Diarrhoea. *BMJ* **1978**, *2*, 1667–1669, doi:10.1136/bmj.2.6153.1667.
10. Kelly, C.P.; LaMont, J.T. *Clostridium Difficile* — More Difficult Than Ever. *N Engl J Med* **2008**, *359*, 1932–1940, doi:10.1056/NEJMra0707500.
11. Piepenbrink, K.H.; Maldarelli, G.A.; de la Peña, C.F.M.; Mulvey, G.L.; Snyder, G.A.; De Masi, L.; von Rosenvinge, E.C.; Günther, S.; Armstrong, G.D.; Donnenberg, M.S.; et al. Structure of *Clostridium Difficile* PilJ Exhibits Unprecedented Divergence from Known Type IV Pilins. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 4334–4345, doi:10.1074/jbc.M113.534404.
12. Purcell, E.B.; McKee, R.W.; Bordeleau, E.; Burrus, V.; Tamayo, R. Regulation of Type IV Pili Contributes to Surface Behaviors of Historical and Epidemic Strains of *Clostridium Difficile*. *J Bacteriol* **2016**, *198*, 565–577, doi:10.1128/JB.00816-15.
13. Bordeleau, E.; Purcell, E.B.; Lafontaine, D.A.; Fortier, L.-C.; Tamayo, R.; Burrus, V. Cyclic Di-GMP Riboswitch-Regulated Type IV Pili Contribute to Aggregation of *Clostridium Difficile*. *J Bacteriol* **2015**, *197*, 819–832, doi:10.1128/JB.02340-14.
14. Ng, K.M.; Ferreyra, J.A.; Higginbottom, S.K.; Lynch, J.B.; Kashyap, P.C.; Gopinath, S.; Naidu, N.; Choudhury, B.; Weimer, B.C.; Monack, D.M.; et al. Microbiota-Liberated Host Sugars Facilitate Post-Antibiotic Expansion of Enteric Pathogens. *Nature* **2013**, *502*, 96–99, doi:10.1038/nature12503.
15. Ferreyra, J.A.; Wu, K.J.; Hryckowian, A.J.; Bouley, D.M.; Weimer, B.C.; Sonnenburg, J.L. Gut Microbiota-Produced Succinate Promotes *C. Difficile* Infection after Antibiotic Treatment or Motility Disturbance. *Cell Host & Microbe* **2014**, *16*, 770–777, doi:10.1016/j.chom.2014.11.003.
16. Højby, N. Understanding Bacterial Biofilms in Patients with Cystic Fibrosis: Current and Innovative Approaches to Potential Therapies. *Journal of Cystic Fibrosis* **2002**, *1*, 249–254, doi:10.1016/S1569-1993(02)00104-2.
17. de Vos, W.M. Microbial Biofilms and the Human Intestinal Microbiome. *npj Biofilms Microbiomes* **2015**, *1*, 15005, doi:10.1038/npjbiofilms.2015.5.
18. Buffie, C.G.; Bucci, V.; Stein, R.R.; McKenney, P.T.; Ling, L.; Gobourne, A.; No, D.; Liu, H.; Kinnebrew, M.; Viale, A.; et al. Precision Microbiome Reconstitution Restores Bile Acid

- Mediated Resistance to *Clostridium Difficile*. *Nature* **2015**, *517*, 205–208, doi:10.1038/nature13828.
19. Francis, M.B.; Allen, C.A.; Shrestha, R.; Sorg, J.A. Bile Acid Recognition by the *Clostridium Difficile* Germinant Receptor, CspC, Is Important for Establishing Infection. *PLoS Pathog* **2013**, *9*, e1003356, doi:10.1371/journal.ppat.1003356.
 20. McGarr, S.E.; Ridlon, J.M.; Hylemon, P.B. Diet, Anaerobic Bacterial Metabolism, and Colon Cancer: A Review of the Literature. *J Clin Gastroenterol* **2005**, *39*, 98–109.
 21. Bernstein, H.; Bernstein, C.; Payne, C.M.; Dvorakova, K.; Garewal, H. Bile Acids as Carcinogens in Human Gastrointestinal Cancers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2005**, *589*, 47–65, doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.001.
 22. Sorg, J.A.; Sonenshein, A.L. Bile Salts and Glycine as Cogerminants for *Clostridium Difficile* Spores. *J Bacteriol* **2008**, *190*, 2505–2512, doi:10.1128/JB.01765-07.
 23. Chen, X.; Katchar, K.; Goldsmith, J.D.; Nanthakumar, N.; Cheknis, A.; Gerding, D.N.; Kelly, C.P. A Mouse Model of *Clostridium Difficile*–Associated Disease. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 1984–1992, doi:10.1053/j.gastro.2008.09.002.
 24. Sammons, J.S.; Toltzis, P.; Zaoutis, T.E. *Clostridium Difficile* Infection in Children. *JAMA Pediatr* **2013**, *167*, 567, doi:10.1001/jamapediatrics.2013.441.
 25. Bryant, K.; McDonald, L.C. *Clostridium Difficile* Infections in Children. *Pediatric Infectious Disease Journal* **2009**, *28*, 145–146, doi:10.1097/INF.0b013e318198c984.
 26. Eglow, R.; Pothoulakis, C.; Itzkowitz, S.; Israel, E.J.; O’Keane, C.J.; Gong, D.; Gao, N.; Xu, Y.L.; Walker, W.A.; LaMont, J.T. Diminished *Clostridium Difficile* Toxin A Sensitivity in Newborn Rabbit Ileum Is Associated with Decreased Toxin A Receptor. *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 822–829, doi:10.1172/JCI115957.
 27. Shim, J.O. *Clostridium Difficile* in Children: To Treat or Not to Treat? *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* **2014**, *17*, 80, doi:10.5223/pghn.2014.17.2.80.
 28. Stabler, R.A.; Gerding, D.N.; Songer, J.G.; Drudy, D.; Brazier, J.S.; Trinh, H.T.; Witney, A.A.; Hinds, J.; Wren, B.W. Comparative Phylogenomics of *Clostridium Difficile* Reveals Clade Specificity and Microevolution of Hypervirulent Strains. *J Bacteriol* **2006**, *188*, 7297–7305, doi:10.1128/JB.00664-06.
 29. El Meouche, I.; Peltier, J.; Monot, M.; Soutourina, O.; Pestel-Caron, M.; Dupuy, B.; Pons, J.-L. Characterization of the SigD Regulon of *C. Difficile* and Its Positive Control of Toxin Production through the Regulation of TcdR. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e83748, doi:10.1371/journal.pone.0083748.
 30. Kelly, C.P.; Kyne, L. The Host Immune Response to *Clostridium Difficile*. *Journal of Medical Microbiology* **2011**, *60*, 1070–1079, doi:10.1099/jmm.0.030015-0.
 31. Gruver, A.; Hudson, L.; Sempowski, G. Immunosenescence of Ageing. *J. Pathol.* **2007**, *211*, 144–156, doi:10.1002/path.2104.
 32. Kochan, T.J.; Somers, M.J.; Kaiser, A.M.; Shoshiev, M.S.; Hagan, A.K.; Hastie, J.L.; Giordano, N.P.; Smith, A.D.; Schubert, A.M.; Carlson, P.E.; et al. Intestinal Calcium and Bile Salts Facilitate Germination of *Clostridium Difficile* Spores. *PLoS Pathog* **2017**, *13*, e1006443, doi:10.1371/journal.ppat.1006443.
 33. Rémond, D.; Shahar, D.R.; Gille, D.; Pinto, P.; Kachal, J.; Peyron, M.-A.; Dos Santos, C.N.; Walther, B.; Bordoni, A.; Dupont, D.; et al. Understanding the Gastrointestinal Tract of the Elderly to Develop Dietary Solutions That Prevent Malnutrition. *Oncotarget* **2015**, *6*, 13858–13898, doi:10.18632/oncotarget.4030.
 34. van Abel, M.; Huybers, S.; Hoenderop, J.G.J.; van der Kemp, A.W.C.M.; van Leeuwen, J.P.T.M.; Bindels, R.J.M. Age-Dependent Alterations in Ca²⁺ Homeostasis: Role of TRPV5 and TRPV6. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2006**, *291*, F1177–F1183, doi:10.1152/ajprenal.00038.2006.
 35. Woodmansey, E.J. Intestinal Bacteria and Ageing. *J Appl Microbiol* **2007**, *102*, 1178–1186, doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03400.x.
 36. Privitera, G.; Scarpellini, P.; Ortisi, G.; Nicastro, G.; Nicolini, R.; de Lalla, F. Prospective Study of *Clostridium Difficile* Intestinal Colonization and Disease Following Single-Dose Antibiotic Prophylaxis in Surgery. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, *35*, 208–210, doi:10.1128/AAC.35.1.208.

37. Eze, P.; Balsells, E.; Kyaw, M.H.; Nair, H. Risk Factors for Clostridium Difficile Infections – an Overview of the Evidence Base and Challenges in Data Synthesis. *Journal of Global Health* **2017**, *7*, 010417, doi:10.7189/jogh.07.010417.
38. Bignardi, G.E. Risk Factors for Clostridium Difficile Infection. *Journal of Hospital Infection* **1998**, *40*, 1–15, doi:10.1016/S0195-6701(98)90019-6.
39. Furuya-Kanamori, L.; Stone, J.C.; Clark, J.; McKenzie, S.J.; Yakob, L.; Paterson, D.L.; Riley, T.V.; Doi, S.A.R.; Clements, A.C. Comorbidities, Exposure to Medications, and the Risk of Community-Acquired *Clostridium Difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2015**, *36*, 132–141, doi:10.1017/ice.2014.39.
40. Brown, K.A.; Khanafer, N.; Daneman, N.; Fisman, D.N. Meta-Analysis of Antibiotics and the Risk of Community-Associated Clostridium Difficile Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57*, 2326–2332, doi:10.1128/AAC.02176-12.
41. Slimings, C.; Riley, T.V. Antibiotics and Hospital-Acquired Clostridium Difficile Infection: Update of Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2014**, *69*, 881–891, doi:10.1093/jac/dkt477.
42. Deshpande, A.; Pasupuleti, V.; Thota, P.; Pant, C.; Rolston, D.D.K.; Sferra, T.J.; Hernandez, A.V.; Donskey, C.J. Community-Associated Clostridium Difficile Infection and Antibiotics: A Meta-Analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2013**, *68*, 1951–1961, doi:10.1093/jac/dkt129.
43. Freedberg, D.E.; Salmasian, H.; Friedman, C.; Abrams, J.A. Proton Pump Inhibitors and Risk for Recurrent Clostridium Difficile Infection Among Inpatients. *American Journal of Gastroenterology* **2013**, *108*, 1794–1801, doi:10.1038/ajg.2013.333.
44. Khan, A.; Raza, S.; A. Batul, S.; Khan, M.; Aksoy, T.; A. Baig, M.; J. Berger, B. The Evolution of Clostridium Difficile Infection in Cancer Patients: Epidemiology, Pathophysiology, and Guidelines for Prevention and Management. *PRI* **2012**, *7*, 157–170, doi:10.2174/157489112801619674.
45. Mounsey, A.; Lacy Smith, K.; Reddy, V.C.; Nickolich, S. Global Epidemiology of Clostridium Difficile Infection in 2010. *Am Fam Physician* **2020**, *101*, 168–175.
46. van Prehn, J.; Reigadas, E.; Vogelzang, E.H.; Bouza, E.; Hristea, A.; Guery, B.; Krutova, M.; Norén, T.; Allerberger, F.; Coia, J.E.; et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 Update on the Treatment Guidance Document for Clostridioides Difficile Infection in Adults. *Clinical Microbiology and Infection* **2021**, *27*, S1–S21, doi:10.1016/j.cmi.2021.09.038.
47. Bartlett, J.G.; Gerding, D.N. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium Difficile* Infection. *CLIN INFECT DIS* **2008**, *46*, S12–S18, doi:10.1086/521863.
48. McDonald, L.C.; Killgore, G.E.; Thompson, A.; Owens, R.C.; Kazakova, S.V.; Sambol, S.P.; Johnson, S.; Gerding, D.N. An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium Difficile*. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 2433–2441, doi:10.1056/NEJMoa051590.
49. Harbrecht, B.G.; Franklin, G.A.; Shirley, R.M.; Smith, J.W.; Miller, F.B.; Richardson, J.D. Statewide Experience with *Clostridium Difficile* Colitis in Academic and Non-Academic Medical Centers. *Surgical Infections* **2012**, *13*, 88–92, doi:10.1089/sur.2009.033.
50. Khanna, S.; Pardi, D.S. The Growing Incidence and Severity of *Clostridium Difficile* Infection in Inpatient and Outpatient Settings. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **2010**, *4*, 409–416, doi:10.1586/egh.10.48.
51. Seksik, P. Colite à Clostridium difficile : quelle prise en charge en 2019 ? *Association Française de Formation Médicale Continue en Hépatogastro-Entérologie* 2019, 81–90.
52. McDonald, L.C.; Owings, M.; Jernigan, D.B. *Clostridium Difficile* Infection in Patients Discharged from US Short-Stay Hospitals, 1996–20031. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 409–415, doi:10.3201/eid1205.051064.
53. Pepin, J.; Alary, M.-E.; Valiquette, L.; Raiche, E.; Ruel, J.; Fulop, K.; Godin, D.; Bourassa, C. Increasing Risk of Relapse after Treatment of Clostridium Difficile Colitis in Quebec, Canada. *Clinical Infectious Diseases* **2005**, *40*, 1591–1597, doi:10.1086/430315.
54. Barbut, F.; Delmée, M.; Brazier, J.S.; Petit, J.C.; Poxton, I.R.; Rupnik, M.; Lalande, V.; Schneider, C.; Mastrantonio, P.; Alonso, R.; et al. A European Survey of Diagnostic Methods and Testing Protocols for Clostridium Difficile. *Clinical Microbiology and Infection* **2003**, *9*, 989–996, doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00683.x.

55. Bauer, M.P.; Notermans, D.W.; van Benthem, B.H.; Brazier, J.S.; Wilcox, M.H.; Rupnik, M.; Monnet, D.L.; van Dissel, J.T.; Kuijper, E.J. Clostridium Difficile Infection in Europe: A Hospital-Based Survey. *The Lancet* **2011**, *377*, 63–73, doi:10.1016/S0140-6736(10)61266-4.
56. Krutova, M.; Kinross, P.; Barbut, F.; Hajdu, A.; Wilcox, M.H.; Kuijper, E.J.; Allerberger, F.; Delmée, M.; Van Broeck, J.; Vatcheva-Dobrevska, R.; et al. How to: Surveillance of Clostridium Difficile Infections. *Clinical Microbiology and Infection* **2018**, *24*, 469–475, doi:10.1016/j.cmi.2017.12.008.
57. Asensio, A.; Vaque-Rafart, J.; Calbo-Torrecillas, F.; Gestal-Otero, J.J.; López-Fernández, F.; Trilla-Garcia, A.; Canton, R.; EPINE Working Group Increasing Rates in Clostridium Difficile Infection (CDI) among Hospitalised Patients, Spain 1999-2007. *Euro Surveill* **2008**, *13*, 18943.
58. Miller, B.A.; Chen, L.F.; Sexton, D.J.; Anderson, D.J. Comparison of the Burdens of Hospital-Onset, Healthcare Facility-Associated *Clostridium Difficile* Infection and of Healthcare-Associated Infection Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Community Hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2011**, *32*, 387–390, doi:10.1086/659156.
59. De Roo, A.C.; Regenbogen, S.E. Clostridium Difficile Infection: An Epidemiology Update. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* **2020**, *33*, 049–057, doi:10.1055/s-0040-1701229.
60. Fu, Y.; Luo, Y.; Grinspan, A.M. Epidemiology of Community-Acquired and Recurrent *Clostridioides Difficile* Infection. *Therap Adv Gastroenterol* **2021**, *14*, 175628482110162, doi:10.1177/17562848211016248.
61. Tachon, M.; Cattoen, C.; Blanckaert, K.; Poujol, I.; Carbonne, A.; Barbut, F.; Petit, J.C.; Coignard, B. First Cluster of C. Difficile Toxinotype III, PCR-Ribotype 027 Associated Disease in France: Preliminary Report. *Weekly releases (1997–2007)* **2006**, *11*, doi:10.2807/esw.11.18.02951-en.
62. Sylvie Maugat, Valérie Pontières; Mélanie Colomb-Cotinat; Sophan Soing-Altrach; Marion Subiros; Claude Bernet, Hervé Blanchard, Loïc Simon, Anne-Gaëlle Venier, Hélène Sénéchal, Yann Savitch; Sophie Vaux; Anne Berger-Carbonne; Bruno Coignard BILAN 2001-2017 DES SIGNALEMENTS EXTERNES D'INFECTIONS NOSOCOMIALES. PART DES SIGNALEMENTS IMPLIQUANT UNE BACTÉRIE MULTIRÉSISTANTE, HAUTEMENT RÉSISTANTE-ÉMERGENTE OU UN CLOSTRIDIUM DIFFICILE 2018, (25-26); 522-9.
63. Coignard, B.; Barbut, F.; Blanckaert, K.; Thiolet, J.-M.; Carbonne, A.; Poujol, I.; Lalande, V.; Lemée, L.; Mory, F.; Marchandin, H.; et al. Actualité des infections digestives à Clostridium difficile, France, 2007. *Revue Francophone des Laboratoires* **2007**, *2007*, 41–48, doi:10.1016/S1773-035X(07)80362-5.
64. Eckert, C.; Coignard, B.; Hebert, M.; Tarnaud, C.; Tessier, C.; Lemire, A.; Burghoffer, B.; Noel, D.; Barbut, F. Clinical and Microbiological Features of Clostridium Difficile Infections in France: The ICD-RAISIN 2009 National Survey. *Médecine et Maladies Infectieuses* **2013**, *43*, 67–74, doi:10.1016/j.medmal.2013.01.004.
65. Modification de La Nomenclature Des Actes de Biologie Médicale Pour Les Actes de Diagnostic Biologique Des Infections à Clostridium Difficile 2016.
66. Kurd, M.F.; Pulido, L.; Joshi, A.; Purtill, J.J.; Parvizi, J. Clostridium Difficile Infection After Total Joint Arthroplasty: Who Is at Risk? *The Journal of Arthroplasty* **2008**, *23*, 839–842, doi:10.1016/j.arth.2007.10.033.
67. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*; Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019;
68. Laura Mulcahy Deaths Involving Clostridium Difficile, England and Wales: 2012. Office for National Statistics. Disponible Sur : <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/birthsdeathsandmarriages/deaths/bulletins/deaths-involving-clostridium-difficile-england-and-wales/2013-08-22> 2013.
69. Pepin, J. Clostridium Difficile-Associated Diarrhea in a Region of Quebec from 1991 to 2003: A Changing Pattern of Disease Severity. *Canadian Medical Association Journal* **2004**, *171*, 466–472, doi:10.1503/cmaj.1041104.
70. Loo, V.G.; Poirier, L.; Miller, M.A.; Oughton, M.; Libman, M.D.; Michaud, S.; Bourgault, A.-M.; Nguyen, T.; Frenette, C.; Kelly, M.; et al. A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium Difficile* –Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 2442–2449, doi:10.1056/NEJMoa051639.

71. Micek, S.T.; Schramm, G.; Morrow, L.; Frazee, E.; Personett, H.; Doherty, J.A.; Hampton, N.; Hoban, A.; Lieu, A.; McKenzie, M.; et al. Clostridium Difficile Infection: A Multicenter Study of Epidemiology and Outcomes in Mechanically Ventilated Patients. *Critical Care Medicine* **2013**, *41*, 1968–1975, doi:10.1097/CCM.0b013e31828a40d5.
72. Barbut, F.; Lalande, V.; Petit, J.-C. Épidémiologie et prévention des infections digestives à Clostridium difficile. *Revue Française des Laboratoires* **2004**, *2004*, 27–34, doi:10.1016/S0338-9898(04)80022-2.
73. Autoren: Weitere Mitglieder der Leitlinienkommission in alphabetischer Reihenfolge einschließlich Affiliation: S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple. *Z Gastroenterol* **2015**, *53*, 418–459, doi:10.1055/s-0034-1399337.
74. Manthey, C.F.; Eckmann, L.; Fuhrmann, V. Therapy for *Clostridium Difficile* Infection – Any News beyond Metronidazole and Vancomycin? *Expert Review of Clinical Pharmacology* **2017**, *10*, 1239–1250, doi:10.1080/17512433.2017.1362978.
75. Rodríguez-Pardo, D.; Mirelis, B.; Navarro, F. Infecciones producidas por Clostridium difficile. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2013**, *31*, 254–263, doi:10.1016/j.eimc.2012.12.010.
76. Abou Chakra, C.N.; Pepin, J.; Sirard, S.; Valiquette, L. Risk Factors for Recurrence, Complications and Mortality in Clostridium Difficile Infection: A Systematic Review. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98400, doi:10.1371/journal.pone.0098400.
77. McDonald, L.C.; Gerding, D.N.; Johnson, S.; Bakken, J.S.; Carroll, K.C.; Coffin, S.E.; Dubberke, E.R.; Garey, K.W.; Gould, C.V.; Kelly, C.; et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium Difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases* **2018**, *66*, 987–994, doi:10.1093/cid/ciy149.
78. Patel, I.; Wungjiranirun, M.; Theethira, T.; Villafuerte-Galvez, J.; Castillo, N.; Akbari, M.; Alonso, C.D.; Leffler, D.A.; Kelly, C.P. Lack of Adherence to SHEA-IDSA Treatment Guidelines for *Clostridium Difficile* Infection Is Associated with Increased Mortality. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 574–581, doi:10.1093/jac/dkw423.
79. Trubiano, J.A.; Cheng, A.C.; Korman, T.M.; Roder, C.; Campbell, A.; May, M.L.A.; Blyth, C.C.; Ferguson, J.K.; Blackmore, T.K.; Riley, T.V.; et al. Australasian Society of Infectious Diseases Updated Guidelines for the Management of *Clostridium Difficile* Infection in Adults and Children in Australia and New Zealand: CDI Management Guidelines. *Intern Med J* **2016**, *46*, 479–493, doi:10.1111/imj.13027.
80. Crobach, M.J.T.; Planche, T.; Eckert, C.; Barbut, F.; Terveer, E.M.; Dekkers, O.M.; Wilcox, M.H.; Kuijper, E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Diagnostic Guidance Document for Clostridium Difficile Infection. *Clinical Microbiology and Infection* **2016**, *22*, S63–S81, doi:10.1016/j.cmi.2016.03.010.
81. Gerding, D.N.; Cornely, O.A.; Grill, S.; Kracker, H.; Marrast, A.C.; Nord, C.E.; Talbot, G.H.; Buitrago, M.; Gheorghe Diaconescu, I.; Murta de Oliveira, C.; et al. Cadazolid for the Treatment of Clostridium Difficile Infection: Results of Two Double-Blind, Placebo-Controlled, Non-Inferiority, Randomised Phase 3 Trials. *The Lancet Infectious Diseases* **2019**, *19*, 265–274, doi:10.1016/S1473-3099(18)30614-5.
82. Carlson, T.J.; Endres, B.T.; Bassères, E.; Gonzales-Luna, A.J.; Garey, K.W. Ridinilazole for the Treatment of *Clostridioides Difficile* Infection. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2019**, *28*, 303–310, doi:10.1080/13543784.2019.1582640.
83. Edwards, D.I. Reduction of Nitroimidazoles in Vitro and DNA Damage. *Biochemical Pharmacology* **1986**, *35*, 53–58, doi:10.1016/0006-2952(86)90554-X.
84. Freeman, C.D.; Klutman, N.E.; Lamp, K.C. Metronidazole: A Therapeutic Review and Update. *Drugs* **1997**, *54*, 679–708, doi:10.2165/00003495-199754050-00003.
85. Jakobsson, H.E.; Jernberg, C.; Andersson, A.F.; Sjölund-Karlsson, M.; Jansson, J.K.; Engstrand, L. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9836, doi:10.1371/journal.pone.0009836.
86. Zar, F.A.; Bakkanagari, S.R.; Moorthi, K.M.L.S.T.; Davis, M.B. A Comparison of Vancomycin and Metronidazole for the Treatment of Clostridium Difficile-Associated Diarrhea, Stratified by Disease Severity. *Clinical Infectious Diseases* **2007**, *45*, 302–307, doi:10.1086/519265.

87. Johnson, S.; Louie, T.J.; Gerding, D.N.; Cornely, O.A.; Chasan-Taber, S.; Fitts, D.; Gelone, S.P.; Broom, C.; Davidson, D.M.; for the Polymer Alternative for CDI Treatment (PACT) investigators Vancomycin, Metronidazole, or Tolevamer for Clostridium Difficile Infection: Results From Two Multinational, Randomized, Controlled Trials. *Clinical Infectious Diseases* **2014**, *59*, 345–354, doi:10.1093/cid/ciu313.
88. Patel, S.; Preuss, C.V.; Bernice, F. Vancomycin. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
89. Liu, C.; Bayer, A.; Cosgrove, S.E.; Daum, R.S.; Fridkin, S.K.; Gorwitz, R.J.; Kaplan, S.L.; Karchmer, A.W.; Levine, D.P.; Murray, B.E.; et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infections in Adults and Children: Executive Summary. *Clinical Infectious Diseases* **2011**, *52*, 285–292, doi:10.1093/cid/cir034.
90. Gonzales, M.; Pepin, J.; Frost, E.H.; Carrier, J.C.; Sirard, S.; Fortier, L.-C.; Valiquette, L. Faecal Pharmacokinetics of Orally Administered Vancomycin in Patients with Suspected Clostridium Difficile Infection. *BMC Infect Dis* **2010**, *10*, 363, doi:10.1186/1471-2334-10-363.
91. Chotiprasitsakul, D.; Santanirand, P.; Thitichai, P.; Rotjanapan, P.; Watcharananan, S.; Siriarayapon, P.; Chaihongsa, N.; Sirichot, S.; Chitasombat, M.; Chantharit, P.; et al. EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF THE FIRST REPORTED VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCUS OUTBREAK AT A TERTIARY-CARE HOSPITAL IN BANGKOK, THAILAND. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **2016**, *47*, 494–502.
92. Hemapanpaioa, J.; Changpradub, D.; Thunyaharn, S.; Santimaleeworagun, W. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infection in a Thai University Hospital: Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Synergistic Effect. *IDR* **2019**, *Volume 12*, 2049–2057, doi:10.2147/IDR.S208298.
93. Goldstein, E.J.C.; Babakhani, F.; Citron, D.M. Antimicrobial Activities of Fidaxomicin. *Clinical Infectious Diseases* **2012**, *55*, S143–S148, doi:10.1093/cid/cis339.
94. Glaus, F.; Altmann, K.-H. Total Synthesis of the Tiacumicin B (Lipiamycin A3/Fidaxomicin) Aglycone. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1937–1940, doi:10.1002/anie.201409510.
95. Mikamo, H.; Tateda, K.; Yanagihara, K.; Kusachi, S.; Takesue, Y.; Miki, T.; Oizumi, Y.; Gamo, K.; Hashimoto, A.; Toyoshima, J.; et al. Efficacy and Safety of Fidaxomicin for the Treatment of Clostridioides (Clostridium) Difficile Infection in a Randomized, Double-Blind, Comparative Phase III Study in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2018**, *24*, 744–752, doi:10.1016/j.jiac.2018.05.010.
96. Johnson, S.; Lavergne, V.; Skinner, A.M.; Gonzales-Luna, A.J.; Garey, K.W.; Kelly, C.P.; Wilcox, M.H. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of Clostridioides Difficile Infection in Adults. *Clinical Infectious Diseases* **2021**, *73*, e1029–e1044, doi:10.1093/cid/ciab549.
97. Scarpignato, C.; Pelosini, I. Rifaximin, a Poorly Absorbed Antibiotic: Pharmacology and Clinical Potential. *Chemotherapy* **2005**, *51*, 36–66, doi:10.1159/000081990.
98. Garey, K.W.; Ghantaji, S.S.; Shah, D.N.; Habib, M.; Arora, V.; Jiang, Z.-D.; DuPont, H.L. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study to Assess the Ability of Rifaximin to Prevent Recurrent Diarrhoea in Patients with Clostridium Difficile Infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, *66*, 2850–2855, doi:10.1093/jac/dkr377.
99. Caspers, P.; Locher, H.H.; Pfaff, P.; Diggelmann, S.; Rueedi, G.; Bur, D.; Ritz, D. Different Resistance Mechanisms for Cadazolid and Linezolid in Clostridium Difficile Found by Whole-Genome Sequencing Analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61*, e00384-17, doi:10.1128/AAC.00384-17.
100. O'Connor, J.R.; Galang, M.A.; Sambol, S.P.; Hecht, D.W.; Vedantam, G.; Gerding, D.N.; Johnson, S. Rifampin and Rifaximin Resistance in Clinical Isolates of Clostridium Difficile. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, *52*, 2813–2817, doi:10.1128/AAC.00342-08.
101. Petrosillo, N. Tackling the Recurrence of Clostridium Difficile Infection. *Médecine et Maladies Infectieuses* **2018**, *48*, 18–22, doi:10.1016/j.medmal.2017.10.007.
102. Mikamo, H.; Aoyama, N.; Sawata, M.; Fujimoto, G.; Dorr, M.B.; Yoshinari, T. The Effect of Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium Difficile Infection (CDI) in Japanese

- Patients. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2018**, *24*, 123–129, doi:10.1016/j.jiac.2017.10.005.
103. Scheinfeld, N.; Biggers, K. Tolevamer, an Orally Administered, Toxin-Binding Polymer for Clostridium Difficile-Associated Diarrhea. *Curr Opin Investig Drugs* **2008**, *9*, 913–924.
 104. Vindigni, S.M.; Surawicz, C.M. Fecal Microbiota Transplantation. *Gastroenterology Clinics of North America* **2017**, *46*, 171–185, doi:10.1016/j.gtc.2016.09.012.
 105. Cammarota, G.; Ianiro, G.; Gasbarrini, A. Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of Clostridium Difficile Infection: A Systematic Review. *Journal of Clinical Gastroenterology* **2014**, *48*, 693–702, doi:10.1097/MCG.0000000000000046.
 106. Ianiro, G.; Mullish, B.H.; Kelly, C.R.; Sokol, H.; Kassam, Z.; Ng, S.C.; Fischer, M.; Allegretti, J.R.; Masucci, L.; Zhang, F.; et al. Screening of Faecal Microbiota Transplant Donors during the COVID-19 Outbreak: Suggestions for Urgent Updates from an International Expert Panel. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **2020**, *5*, 430–432, doi:10.1016/S2468-1253(20)30082-0.
 107. On behalf of the CME Committee of the SSAT; Kaiser, A.M.; Hogen, R.; Bordeianou, L.; Alavi, K.; Wise, P.E.; Sudan, R. Clostridium Difficile Infection from a Surgical Perspective. *J Gastrointest Surg* **2015**, *19*, 1363–1377, doi:10.1007/s11605-015-2785-4.
 108. Gerding, D.N.; Sambol, S.P.; Johnson, S. Non-Toxigenic Clostridioides (Formerly Clostridium) Difficile for Prevention of C. Difficile Infection: From Bench to Bedside Back to Bench and Back to Bedside. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1700, doi:10.3389/fmicb.2018.01700.
 109. Rode, A.A.; Chehri, M.; Krogsgaard, L.R.; Heno, K.K.; Svendsen, A.T.; Ribberholt, I.; Helms, M.; Engberg, J.; Schønning, K.; Tvede, M.; et al. Randomised Clinical Trial: A 12-Strain Bacterial Mixture versus Faecal Microbiota Transplantation versus Vancomycin for Recurrent Clostridioides Difficile Infections. *Aliment Pharmacol Ther* **2021**, *53*, 999–1009, doi:10.1111/apt.16309.
 110. Leav, B.A.; Blair, B.; Leney, M.; Knauber, M.; Reilly, C.; Lowy, I.; Gerding, D.N.; Kelly, C.P.; Katchar, K.; Baxter, R.; et al. Serum Anti-Toxin B Antibody Correlates with Protection from Recurrent Clostridium Difficile Infection (CDI). *Vaccine* **2010**, *28*, 965–969, doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.144.
 111. McFarland, L.V. Therapies on the Horizon for Clostridium Difficile Infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2016**, *25*, 541–555, doi:10.1517/13543784.2016.1161025.
 112. NEW YORK--(BUSINESS WIRE)-- Pfizer Inc. (NYSE:PFE) Phase 3 CLOVER Trial for Pfizer's Investigational Clostridioides Difficile Vaccine Indicates Strong Potential Effect in Reducing Duration and Severity of Disease Based on Secondary Endpoints 2022.
 113. Bruxelle, J.-F.; Mizrahi, A.; Hoys, S.; Collignon, A.; Janoir, C.; Péchiné, S. Immunogenic Properties of the Surface Layer Precursor of Clostridium Difficile and Vaccination Assays in Animal Models. *Anaerobe* **2016**, *37*, 78–84, doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.010.
 114. Mizrahi, A.; Collignon, A.; Péchiné, S. Passive and Active Immunization Strategies against Clostridium Difficile Infections: State of the Art. *Anaerobe* **2014**, *30*, 210–219, doi:10.1016/j.anaerobe.2014.07.006.
 115. Oksi, J.; Anttila, V.-J.; Mattila, E. Treatment of Clostridioides (Clostridium) Difficile Infection. *Ann Med* **2020**, *52*, 12–20, doi:10.1080/07853890.2019.1701703.
 116. Bass, S.N.; Lam, S.W.; Bauer, S.R.; Neuner, E.A. Comparison of Oral Vancomycin Capsule and Solution for Treatment of Initial Episode of Severe Clostridium Difficile Infection. *Journal of Pharmacy Practice* **2015**, *28*, 183–188, doi:10.1177/0897190013515925.
 117. Huvelle, S.; Godet, M.; Hecq, J.-D.; Gillet, P.; Jamart, J.; Galanti, L.M. Long-Term Stability of Vancomycin Hydrochloride in Oral Solution: The Brand Name Versus a Generic Product. *Int J Pharm Compd* **2016**, *20*, 347–350.
 118. Norris, A.H.; Shrestha, N.K.; Allison, G.M.; Keller, S.C.; Bhavan, K.P.; Zurlo, J.J.; Hersh, A.L.; Gorski, L.A.; Bosso, J.A.; Rathore, M.H.; et al. 2018 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Management of Outpatient Parenteral Antimicrobial Therapy. *Clinical Infectious Diseases* **2019**, *68*, e1–e35, doi:10.1093/cid/ciy745.
 119. Debast, S.B.; Bauer, M.P.; Kuijper, E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for Clostridium Difficile Infection. *Clinical Microbiology and Infection* **2014**, *20*, 1–26, doi:10.1111/1469-0691.12418.

120. Louie, T.J.; Miller, M.A.; Mullane, K.M.; Weiss, K.; Lentnek, A.; Golan, Y.; Gorbach, S.; Sears, P.; Shue, Y.-K. Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium Difficile* Infection. *N Engl J Med* **2011**, *364*, 422–431, doi:10.1056/NEJMoa0910812.
121. Cornely, O.A.; Crook, D.W.; Esposito, R.; Poirier, A.; Somero, M.S.; Weiss, K.; Sears, P.; Gorbach, S. Fidaxomicin versus Vancomycin for Infection with *Clostridium Difficile* in Europe, Canada, and the USA: A Double-Blind, Non-Inferiority, Randomised Controlled Trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2012**, *12*, 281–289, doi:10.1016/S1473-3099(11)70374-7.
122. Crook, D.W.; Walker, A.S.; Kean, Y.; Weiss, K.; Cornely, O.A.; Miller, M.A.; Esposito, R.; Louie, T.J.; Stoesser, N.E.; Young, B.C.; et al. Fidaxomicin Versus Vancomycin for *Clostridium Difficile* Infection: Meta-Analysis of Pivotal Randomized Controlled Trials. *Clinical Infectious Diseases* **2012**, *55*, S93–S103, doi:10.1093/cid/cis499.
123. Burton, H.E.; Mitchell, S.A.; Watt, M. A Systematic Literature Review of Economic Evaluations of Antibiotic Treatments for *Clostridium Difficile* Infection. *PharmacoEconomics* **2017**, *35*, 1123–1140, doi:10.1007/s40273-017-0540-2.
124. Rajasingham, R.; Enns, E.A.; Khoruts, A.; Vaughn, B.P. Cost-Effectiveness of Treatment Regimens for *Clostridioides Difficile* Infection: An Evaluation of the 2018 Infectious Diseases Society of America Guidelines. *Clinical Infectious Diseases* **2020**, *70*, 754–762, doi:10.1093/cid/ciz318.
125. Rokas, K.E.E.; Johnson, J.W.; Beardsley, J.R.; Ohl, C.A.; Luther, V.P.; Williamson, J.C. The Addition of Intravenous Metronidazole to Oral Vancomycin Is Associated With Improved Mortality in Critically Ill Patients With *Clostridium Difficile* Infection. *Clin Infect Dis.* **2015**, *61*, 934–941, doi:10.1093/cid/civ409.
126. Neal, M.D.; Alverdy, J.C.; Hall, D.E.; Simmons, R.L.; Zuckerbraun, B.S. Diverting Loop Ileostomy and Colonic Lavage: An Alternative to Total Abdominal Colectomy for the Treatment of Severe, Complicated *Clostridium Difficile* Associated Disease. *Annals of Surgery* **2011**, *254*, 423–429, doi:10.1097/SLA.0b013e31822ade48.
127. Cornely, O.A.; Miller, M.A.; Louie, T.J.; Crook, D.W.; Gorbach, S.L. Treatment of First Recurrence of *Clostridium Difficile* Infection: Fidaxomicin Versus Vancomycin. *Clinical Infectious Diseases* **2012**, *55*, S154–S161, doi:10.1093/cid/cis462.
128. Murphy, M.M.; Patatianian, E.; Gales, M.A. Extended Duration Vancomycin in Recurrent *Clostridium Difficile* Infection: A Systematic Review. *Therapeutic Advances in Infection* **2018**, *5*, 111–119, doi:10.1177/2049936118798276.
129. Guery, B.; Menichetti, F.; Anttila, V.-J.; Adomakoh, N.; Aguado, J.M.; Bisnauthsing, K.; Georgopali, A.; Goldenberg, S.D.; Karas, A.; Kazeem, G.; et al. Extended-Pulsed Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium Difficile* Infection in Patients 60 Years and Older (EXTEND): A Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3b/4 Trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2018**, *18*, 296–307, doi:10.1016/S1473-3099(17)30751-X.
130. Banawas, S.S. *Clostridium Difficile* Infections: A Global Overview of Drug Sensitivity and Resistance Mechanisms. *BioMed Research International* **2018**, *2018*, 1–9, doi:10.1155/2018/8414257.
131. Norman, K.N.; Scott, H.M.; Harvey, R.B.; Norby, B.; Hume, M.E. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Among *Clostridium Difficile* Isolated from an Integrated Human and Swine Population in Texas. *Foodborne Pathogens and Disease* **2014**, *11*, 257–264, doi:10.1089/fpd.2013.1648.
132. Freeman, J.; Vernon, J.; Morris, K.; Nicholson, S.; Todhunter, S.; Longshaw, C.; Wilcox, M.H. Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium Difficile* Ribotypes. *Clinical Microbiology and Infection* **2015**, *21*, 248.e9-248.e16, doi:10.1016/j.cmi.2014.09.017.
133. Leffler, D.A.; Lamont, J.T. *Clostridium Difficile* Infection. *N Engl J Med* **2015**, *372*, 1539–1548, doi:10.1056/NEJMra1403772.
134. Pituch, H.; Braak, N. van den; Leeuwen, W. van; Belkum, A. van; Martirosian, G.; Obuch-Woszczatyński, P.; Łuczak, M.; Meisel-Mikołajczyk, F. Clonal Dissemination of a Toxin-A-Negative/Toxin-B-Positive *Clostridium Difficile* Strain from Patients with Antibiotic-Associated Diarrhea in Poland. *Clinical Microbiology and Infection* **2001**, *7*, 442–446, doi:10.1046/j.1198-743x.2001.00312.x.

135. Goorhuis, A.; Legaria, M.C.; van den Berg, R.J.; Harmanus, C.; Klaassen, C.H.W.; Brazier, J.S.; Lumelsky, G.; Kuijper, E.J. Application of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis to Determine Clonal Spread of Toxin A-Negative *Clostridium Difficile* in a General Hospital in Buenos Aires, Argentina. *Clinical Microbiology and Infection* **2009**, *15*, 1080–1086, doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02759.x.
136. Kuijper, E.; Weerd, J.; Kato, H.; Kato, N.; Dam, A.; Vorm, E.; Weel, J.; Rhee, C.; Dankert, J. Nosocomial Outbreak of *Clostridium Difficile*-Associated Diarrhoea Due to a Clindamycin-Resistant Enterotoxin A-Negative Strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2001**, *20*, 528–534, doi:10.1007/s100960100550.
137. He, M.; Miyajima, F.; Roberts, P.; Ellison, L.; Pickard, D.J.; Martin, M.J.; Connor, T.R.; Harris, S.R.; Fairley, D.; Bamford, K.B.; et al. Emergence and Global Spread of Epidemic Healthcare-Associated *Clostridium Difficile*. *Nat Genet* **2013**, *45*, 109–113, doi:10.1038/ng.2478.
138. Toth, M.; Stewart, N.K.; Smith, C.; Vakulenko, S.B. Intrinsic Class D β -Lactamases of *Clostridium Difficile*. *mBio* **2018**, *9*, e01803-18, doi:10.1128/mBio.01803-18.
139. Isidro, J.; Santos, A.; Nunes, A.; Borges, V.; Silva, C.; Vieira, L.; Mendes, A.L.; Serrano, M.; Henriques, A.O.; Gomes, J.P.; et al. Imipenem Resistance in *Clostridium Difficile* Ribotype 017, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 741–745, doi:10.3201/eid2404.170095.
140. Knight Daniel R.; Androga Grace O.; Ballard Susan A.; Howden Benjamin P.; Riley Thomas V. A Phenotypically Silent VanB2 Operon Carried on a Tn1549-Like Element in *Clostridium Difficile*. *mSphere* **2016**, *1*, e00177-16, doi:10.1128/mSphere.00177-16.
141. Spigaglia, P. Recent Advances in the Understanding of Antibiotic Resistance in *Clostridium Difficile* Infection. *Therapeutic Advances in Infection* **2016**, *3*, 23–42, doi:10.1177/2049936115622891.
142. Long, K.S.; Vester, B. Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56*, 603–612, doi:10.1128/AAC.05702-11.
143. Dridi, L.; Tankovic, J.; Burghoffer, B.; Barbut, F.; Petit, J.-C. *GyrA* and *GyrB* Mutations Are Implicated in Cross-Resistance to Ciprofloxacin and Moxifloxacin in *Clostridium Difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 3418–3421, doi:10.1128/AAC.46.11.3418-3421.2002.
144. Boekhoud, I.M.; Hornung, B.V.H.; Sevilla, E.; Harmanus, C.; Bos-Sanders, I.M.J.G.; Terveer, E.M.; Bolea, R.; Corver, J.; Kuijper, E.J.; Smits, W.K. Plasmid-Mediated Metronidazole Resistance in *Clostridioides Difficile*. *Nat Commun* **2020**, *11*, 598, doi:10.1038/s41467-020-14382-1.
145. Song, X.; Bartlett, J.G.; Speck, K.; Naegeli, A.; Carroll, K.; Perl, T.M. Rising Economic Impact of *Clostridium Difficile* -Associated Disease in Adult Hospitalized Patient Population. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2008**, *29*, 823–828, doi:10.1086/588756.
146. Dubberke, E.R.; Olsen, M.A. Burden of *Clostridium Difficile* on the Healthcare System. *Clinical Infectious Diseases* **2012**, *55*, S88–S92, doi:10.1093/cid/cis335.
147. Reigadas Ramírez, E.; Bouza, E.S. Economic Burden of *Clostridium Difficile* Infection in European Countries. In *Updates on Clostridium difficile in Europe*; Mastrantonio, P., Rupnik, M., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 1050, pp. 1–12 ISBN 978-3-319-72798-1.
148. Rebmann, T.; Carrico, R.M. Preventing *Clostridium Difficile* Infections: An Executive Summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology’s Elimination Guide. *American Journal of Infection Control* **2011**, *39*, 239–242, doi:10.1016/j.ajic.2010.10.011.
149. Lucado, J.; Gould, C.; Elixhauser, A. *Clostridium Difficile* Infections (CDI) in Hospital Stays, 2009. In *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*; Agency for Healthcare Research and Quality (US): Rockville (MD), 2006.
150. McGlone, S.M.; Bailey, R.R.; Zimmer, S.M.; Popovich, M.J.; Tian, Y.; Ufberg, P.; Muder, R.R.; Lee, B.Y. The Economic Burden of *Clostridium Difficile*. *Clinical Microbiology and Infection* **2012**, *18*, 282–289, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03571.x.
151. Wiegand, P.N.; Nathwani, D.; Wilcox, M.H.; Stephens, J.; Shelbaya, A.; Haider, S. Clinical and Economic Burden of *Clostridium Difficile* Infection in Europe: A Systematic Review of Healthcare-Facility-Acquired Infection. *Journal of Hospital Infection* **2012**, *81*, 1–14, doi:10.1016/j.jhin.2012.02.004.

152. Leanord, A. *The Cost of Clostridium Difficile Infections*; Presentations at the 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2017;
153. Eckert, C.; Barbut, F. Infections à *Clostridium Difficile*. *Med Sci (Paris)* **2010**, *26*, 153–158, doi:10.1051/medsci/2010262153.
154. Le Monnier, A.; Duburcq, A.; Zahar, J.-R.; Corvec, S.; Guillard, T.; Cattoir, V.; Woerther, P.-L.; Fihman, V.; Lalande, V.; Jacquier, H.; et al. Hospital Cost of Clostridium Difficile Infection Including the Contribution of Recurrences in French Acute-Care Hospitals. *Journal of Hospital Infection* **2015**, *91*, 117–122, doi:10.1016/j.jhin.2015.06.017.
155. Davies, K.A.; Longshaw, C.M.; Davis, G.L.; Bouza, E.; Barbut, F.; Barna, Z.; Delmée, M.; Fitzpatrick, F.; Ivanova, K.; Kuijper, E.; et al. Underdiagnosis of Clostridium Difficile across Europe: The European, Multicentre, Prospective, Biannual, Point-Prevalence Study of Clostridium Difficile Infection in Hospitalised Patients with Diarrhoea (EUCLID). *The Lancet Infectious Diseases* **2014**, *14*, 1208–1219, doi:10.1016/S1473-3099(14)70991-0.
156. Davies, K.A.; Ashwin, H.; Longshaw, C.M.; Burns, D.A.; Davis, G.L.; Wilcox, M.H.; on behalf of the EUCLID study group Diversity of Clostridium Difficile PCR Ribotypes in Europe: Results from the European, Multicentre, Prospective, Biannual, Point-Prevalence Study of Clostridium Difficile Infection in Hospitalised Patients with Diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294.
157. Alcalá, L.; Martin, A.; Marin, M.; Sánchez-Somolinos, M.; Catalán, P.; Peláez, T.; Bouza, E. The Undiagnosed Cases of Clostridium Difficile Infection in a Whole Nation: Where Is the Problem? *Clinical Microbiology and Infection* **2012**, *18*, E204–E213, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03883.x.
158. Santos, A.; Isidro, J.; Silva, C.; Boaventura, L.; Diogo, J.; Faustino, A.; Toscano, C.; Oleastro, M. Molecular and Epidemiologic Study of Clostridium Difficile Reveals Unusual Heterogeneity in Clinical Strains Circulating in Different Regions in Portugal. *Clinical Microbiology and Infection* **2016**, *22*, 695–700, doi:10.1016/j.cmi.2016.04.002.
159. Coignard, B.; Barbut, F.; Blanckaert, K.; Thiolet, J.M.; Pujol, I.; Carbonne, A.; Petit, J.C.; Desenclos, J.C. Emergence of Clostridium Difficile Toxinotype III, PCR-Ribotype 027-Associated Disease, France, 2006. *Weekly releases (1997–2007)* **2006**, *11*, doi:10.2807/esw.11.37.03044-en.
160. Birgand, G.; Blanckaert, K.; Carbonne, A.; Coignard, B.; Barbut, F.; Eckert, C.; Grandbastien, B.; Kadi, Z.; Astagneau, P. Investigation of a Large Outbreak of Clostridium Difficile PCR-Ribotype 027 Infections in Northern France, 2006-2007 and Associated Clusters in 2008-2009. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, doi:10.2807/ese.15.25.19597-en.
161. Popoff, M.R.; Rubin, E.J.; Gill, D.M.; Boquet, P. Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase Produced by a Clostridium Difficile Strain. *Infect Immun* **1988**, *56*, 2299–2306, doi:10.1128/iai.56.9.2299-2306.1988.
162. Cookson, B. Hypervirulent Strains of Clostridium Difficile. *Postgraduate Medical Journal* **2007**, *83*, 291–295, doi:10.1136/pgmj.2006.056143.
163. Smith, A. Outbreak of Clostridium Difficile Infection in an English Hospital Linked to Hypertoxin-Producing Strains in Canada and the US. *Weekly releases (1997–2007)* **2005**, *10*, doi:10.2807/esw.10.26.02735-en.
164. Riley, T.V.; Thean, S.; Hool, G.; Golledge, C.L. First Australian Isolation of Epidemic Clostridium Difficile PCR Ribotype 027. *Medical Journal of Australia* **2009**, *190*, 706–708, doi:10.5694/j.1326-5377.2009.tb02644.x.
165. Stabler, R.A.; He, M.; Dawson, L.; Martin, M.; Valiente, E.; Corton, C.; Lawley, T.D.; Sebahia, M.; Quail, M.A.; Rose, G.; et al. Comparative Genome and Phenotypic Analysis of Clostridium Difficile 027 Strains Provides Insight into the Evolution of a Hypervirulent Bacterium. *Genome Biol* **2009**, *10*, R102, doi:10.1186/gb-2009-10-9-r102.
166. Åkerlund, T.; Persson, I.; Unemo, M.; Norén, T.; Svenungsson, B.; Wullt, M.; Burman, L.G. Increased Sporulation Rate of Epidemic Clostridium Difficile Type 027/NAP1. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 1530–1533, doi:10.1128/JCM.01964-07.
167. Planche, T.; Wilcox, M.H. Diagnostic Pitfalls in Clostridium Difficile Infection. *Infectious Disease Clinics of North America* **2015**, *29*, 63–82, doi:10.1016/j.idc.2014.11.008.

168. Riggs, M.M.; Sethi, A.K.; Zabarsky, T.F.; Eckstein, E.C.; Jump, R.L.P.; Donskey, C.J. Asymptomatic Carriers Are a Potential Source for Transmission of Epidemic and Nonepidemic *Clostridium Difficile* Strains among Long-Term Care Facility Residents. *Clinical Infectious Diseases* **2007**, *45*, 992–998, doi:10.1086/521854.
169. Ziakas, P.D.; Zacharioudakis, I.M.; Zervou, F.N.; Grigoras, C.; Pliakos, E.E.; Mylonakis, E. Asymptomatic Carriers of Toxigenic *C. Difficile* in Long-Term Care Facilities: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117195, doi:10.1371/journal.pone.0117195.
170. Samore, M.H.; Venkataraman, L.; DeGirolami, P.C.; Arbeit, R.D.; Karchmer, A.W. Clinical and Molecular Epidemiology of Sporadic and Clustered Cases of Nosocomial *Clostridium Difficile* Diarrhea. *The American Journal of Medicine* **1996**, *100*, 32–40, doi:10.1016/S0002-9343(96)90008-X.
171. Barbut, F.; Petit, J.-C. Epidemiology of *Clostridium Difficile*-Associated Infections. *Clinical Microbiology and Infection* **2001**, *7*, 405–410, doi:10.1046/j.1198-743x.2001.00289.x.
172. Rousseau, C.; Poilane, I.; De Pontual, L.; Maherault, A.-C.; Le Monnier, A.; Collignon, A. *Clostridium Difficile* Carriage in Healthy Infants in the Community: A Potential Reservoir for Pathogenic Strains. *Clinical Infectious Diseases* **2012**, *55*, 1209–1215, doi:10.1093/cid/cis637.
173. Bartlett, J.G. *Clostridium Difficile*: History of Its Role as an Enteric Pathogen and the Current State of Knowledge About the Organism. *Clinical Infectious Diseases* **1994**, *18*, S265–S272, doi:10.1093/clinids/18.Supplement_4.S265.
174. Wozniak, T.M.; Rubin, G.; Raina MacIntyre, C. The Emergence of Community-Acquired *Clostridium Difficile* in an Australian Hospital. *Healthcare infection* **2015**, *20*, 72–77, doi:10.1071/HI15003.
175. Tan, X.Q.; Verrall, A.J.; Jureen, R.; Riley, T.V.; Collins, D.A.; Lin, R.T.; Balm, M.N.; Chan, D.; Tambyah, P.A. The Emergence of Community-Onset *Clostridium Difficile* Infection in a Tertiary Hospital in Singapore: A Cause for Concern. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2014**, *43*, 47–51, doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.09.011.
176. Owens, Jr., R.C.; Donskey, C.J.; Gaynes, R.P.; Loo, V.G.; Muto, C.A. Antimicrobial-Associated Risk Factors for *Clostridium Difficile* Infection. *CLIN INFECT DIS* **2008**, *46*, S19–S31, doi:10.1086/521859.
177. Berdichevski, T.; Keller, N.; Rahav, G.; Bar-Meir, S.; Eliakim, R.; Ben-Horin, S. The Impact of Pseudomembrane Formation on the Outcome of *Clostridium Difficile*-Associated Disease. *Infection* **2013**, *41*, 969–977, doi:10.1007/s15010-013-0473-4.
178. Nomura, K.; Fujimoto, Y.; Yamashita, M.; Morimoto, Y.; Ohshiro, M.; Sato, K.; Oyake, T.; Kowata, S.; Konishi, H.; Yoshikawa, T.; et al. Absence of Pseudomembranes in *Clostridium Difficile* -Associated Diarrhea in Patients Using Immunosuppression Agents. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **2009**, *44*, 74–78, doi:10.1080/00365520802321238.
179. Ben-Horin, S.; Margalit, M.; Bossuyt, P.; Maul, J.; Shapira, Y.; Bojic, D.; Chermesh, I.; Al-Rifai, A.; Schoepfer, A.; Bosani, M.; et al. Prevalence and Clinical Impact of Endoscopic Pseudomembranes in Patients with Inflammatory Bowel Disease and *Clostridium Difficile* Infection. *Journal of Crohn's and Colitis* **2010**, *4*, 194–198, doi:10.1016/j.crohns.2009.11.001.
180. Petit-Laurent, F. Imagerie de la colite pseudomembraneuse. *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue* 1999, 161–163.
181. Lamontagne, F.; Labbé, A.-C.; Haeck, O.; Lesur, O.; Lalancette, M.; Patino, C.; Leblanc, M.; Laverdière, M.; Poirin, J. Impact of Emergency Colectomy on Survival of Patients With Fulminant *Clostridium Difficile* Colitis During an Epidemic Caused by a Hypervirulent Strain: *Annals of Surgery* **2007**, *245*, 267–272, doi:10.1097/01.sla.0000236628.79550.e5.
182. Noblett, S.E.; Welfare, M.; Seymour, K. The Role of Surgery in *Clostridium Difficile* Colitis. *BMJ* **2009**, *338*, b1563–b1563, doi:10.1136/bmj.b1563.
183. O'Donoghue, C.; Kyne, L. Update on *Clostridium Difficile* Infection: *Current Opinion in Gastroenterology* **2011**, *27*, 38–47, doi:10.1097/MOG.0b013e3283411634.
184. Greenstein, A.J.; Byrn, J.C.; Zhang, L.P.; Swedish, K.A.; Jahn, A.E.; Divino, C.M. Risk Factors for the Development of Fulminant *Clostridium Difficile* Colitis. *Surgery* **2008**, *143*, 623–629, doi:10.1016/j.surg.2007.12.008.

185. Abou Chakra, C.N.; Pepin, J.; Valiquette, L. Prediction Tools for Unfavourable Outcomes in Clostridium Difficile Infection: A Systematic Review. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30258, doi:10.1371/journal.pone.0030258.
186. Bagdasarian, N.; Rao, K.; Malani, P.N. Diagnosis and Treatment of *Clostridium Difficile* in Adults: A Systematic Review. *JAMA* **2015**, *313*, 398, doi:10.1001/jama.2014.17103.
187. Blanco, N.; Robinson, G.L.; Heil, E.L.; Perlmutter, R.; Wilson, L.E.; Brown, C.H.; Heavner, M.S.; Nadimpalli, G.; Lemkin, D.; Morgan, D.J.; et al. Impact of a C. Difficile Infection (CDI) Reduction Bundle and Its Components on CDI Diagnosis and Prevention. *American Journal of Infection Control* **2021**, *49*, 319–326, doi:10.1016/j.ajic.2020.10.020.
188. Barbut, F.; Richard, A.; Hamadi, K.; Chomette, V.; Burghoffer, B.; Petit, J.-C. Epidemiology of Recurrences or Reinfections of *Clostridium Difficile* -Associated Diarrhea. *J Clin Microbiol* **2000**, *38*, 2386–2388, doi:10.1128/JCM.38.6.2386-2388.2000.
189. Caron, F.; Ducrotte, P.; Lerebours, E.; Colin, R.; Humbert, G.; Denis, P. Effects of Amoxicillin-Clavulanate Combination on the Motility of the Small Intestine in Human Beings. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, *35*, 1085–1088, doi:10.1128/AAC.35.6.1085.
190. Song, P.H.; Min, J.H.; Kim, Y.S.; Jo, S.Y.; Kim, E.J.; Lee, K.J.; Lee, J.; Sung, H.; Moon, J.S.; Whang, D.H. Rapid and Accurate Diagnosis of *Clostridium Difficile* Infection by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Intest Res* **2018**, *16*, 109, doi:10.5217/ir.2018.16.1.109.
191. Lewis, S.J.; Heaton, K.W. Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **1997**, *32*, 920–924, doi:10.3109/00365529709011203.
192. Alcalá-Hernández, L.; Mena-Ribas, A.; Niubó-Bosh, J.; Marín-Arriaza, M. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2016**, *34*, 595–602, doi:10.1016/j.eimc.2015.09.004.
193. Swale, A.; Miyajima, F.; Roberts, P.; Hall, A.; Little, M.; Beadsworth, M.B.J.; Beeching, N.J.; Kolamunnage-Dona, R.; Parry, C.M.; Pirmohamed, M. Calprotectin and Lactoferrin Faecal Levels in Patients with Clostridium Difficile Infection (CDI): A Prospective Cohort Study. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106118, doi:10.1371/journal.pone.0106118.
194. Carey-Ann, B.D.; Carroll, K.C. Diagnosis of Clostridium Difficile Infection: An Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. *Clin Microbiol Rev* **2013**, *26*, 604–630, doi:10.1128/CMR.00016-13.
195. Delmée, M. Laboratory Diagnosis of Clostridium Difficile Disease. *Clinical Microbiology and Infection* **2001**, *7*, 411–416, doi:10.1046/j.1198-743x.2001.00294.x.
196. Hink, T.; Burnham, C.-A.D.; Dubberke, E.R. A Systematic Evaluation of Methods to Optimize Culture-Based Recovery of Clostridium Difficile from Stool Specimens. *Anaerobe* **2013**, *19*, 39–43, doi:10.1016/j.anaerobe.2012.12.001.
197. George, W.L.; Sutter, V.L.; Citron, D.; Finegold, S.M. Selective and Differential Medium for Isolation of Clostridium Difficile. *J Clin Microbiol* **1979**, *9*, 214–219, doi:10.1128/jcm.9.2.214-219.1979.
198. Eckert, C.; Burghoffer, B.; Lalande, V.; Barbut, F. Evaluation of the Chromogenic Agar ChromID C. Difficile. *J Clin Microbiol* **2013**, *51*, 1002–1004, doi:10.1128/JCM.02601-12.
199. Chen, S.; Gu, H.; Sun, C.; Wang, H.; Wang, J. Rapid Detection of Clostridium Difficile Toxins and Laboratory Diagnosis of Clostridium Difficile Infections. *Infection* **2017**, *45*, 255–262, doi:10.1007/s15010-016-0940-9.
200. Peng, Z.; Ling, L.; Stratton, C.W.; Li, C.; Polage, C.R.; Wu, B.; Tang, Y.-W. Advances in the Diagnosis and Treatment of *Clostridium Difficile* Infections. *Emerging Microbes & Infections* **2018**, *7*, 1–13, doi:10.1038/s41426-017-0019-4.
201. Lee, H.S.; Plechot, K.; Gohil, S.; Le, J. Clostridium Difficile: Diagnosis and the Consequence of Over Diagnosis. *Infect Dis Ther* **2021**, *10*, 687–697, doi:10.1007/s40121-021-00417-7.
202. Gateau, C.; Couturier, J.; Coia, J.; Barbut, F. How to: Diagnose Infection Caused by Clostridium Difficile. *Clinical Microbiology and Infection* **2018**, *24*, 463–468, doi:10.1016/j.cmi.2017.12.005.
203. Gerding, D.N.; Muto, C.A.; Owens, Jr., R.C. Treatment of *Clostridium Difficile* Infection. *CLIN INFECT DIS* **2008**, *46*, S32–S42, doi:10.1086/521860.
204. Rutala, W.A.; Gergen, M.F.; Weber, D.J. Efficacy of Different Cleaning and Disinfection Methods against *Clostridium Difficile* Spores: Importance of Physical Removal versus Sporicidal Inactivation. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2012**, *33*, 1255–1258, doi:10.1086/668434.

205. Bhattacharjee, D.; Francis, M.B.; Ding, X.; McAllister, K.N.; Shrestha, R.; Sorg, J.A. Reexamining the Germination Phenotypes of Several *Clostridium Difficile* Strains Suggests Another Role for the CspC Germinant Receptor. *J Bacteriol* **2016**, *198*, 777–786, doi:10.1128/JB.00908-15.
206. Sorg, J.A.; Sonenshein, A.L. Inhibiting the Initiation of *Clostridium Difficile* Spore Germination Using Analogs of Chenodeoxycholic Acid, a Bile Acid. *J Bacteriol* **2010**, *192*, 4983–4990, doi:10.1128/JB.00610-10.
207. Vernocchi, P.; Del Chierico, F.; Putignani, L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01144.
208. Janoir, C.; Péchiné, S.; Grosdidier, C.; Collignon, A. Cwp84, a Surface-Associated Protein of *Clostridium Difficile*, Is a Cysteine Protease with Degrading Activity on Extracellular Matrix Proteins. *J Bacteriol* **2007**, *189*, 7174–7180, doi:10.1128/JB.00578-07.
209. Waligora, A.-J.; Hennequin, C.; Mullany, P.; Bourlioux, P.; Collignon, A.; Karjalainen, T. Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium Difficile* with Adhesive Properties. *Infect Immun* **2001**, *69*, 2144–2153, doi:10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001.
210. Hennequin, C.; Janoir, C.; Barc, M.-C.; Collignon, A.; Karjalainen, T. Identification and Characterization of a Fibronectin-Binding Protein from *Clostridium Difficile*. *Microbiology* **2003**, *149*, 2779–2787, doi:10.1099/mic.0.26145-0.
211. Hennequin, C.; Porcheray, F.; Waligora-Dupriet, A.; Collignon, A.; Barc, M.; Bourlioux, P.; Karjalainen, T. GroEL (Hsp60) of *Clostridium Difficile* Is Involved in Cell Adherence. *Microbiology (Reading)* **2001**, *147*, 87–96, doi:10.1099/00221287-147-1-87.
212. Cloud, J.; Kelly, C.P. Update on *Clostridium Difficile* Associated Disease: *Current Opinion in Internal Medicine* **2007**, *6*, 131–136, doi:10.1097/MOG.0b013e32801184ac.
213. Calabi, E.; Calabi, F.; Phillips, A.D.; Fairweather, N.F. Binding of *Clostridium Difficile* Surface Layer Proteins to Gastrointestinal Tissues. *Infect Immun* **2002**, *70*, 5770–5778, doi:10.1128/IAI.70.10.5770-5778.2002.
214. Farooq, P.D.; Urrunaga, N.H.; Tang, D.M.; von Rosenvinge, E.C. Pseudomembranous Colitis. *Disease-a-Month* **2015**, *61*, 181–206, doi:10.1016/j.disamonth.2015.01.006.
215. Desai, J.; Elnaggar, M.; Hanfy, A.A.; Doshi, R. Toxic Megacolon: Background, Pathophysiology, Management Challenges and Solutions. *CEG* **2020**, *Volume 13*, 203–210, doi:10.2147/CEG.S200760.
216. Barth, H.; Aktories, K.; Popoff, M.R.; Stiles, B.G. Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common *Clostridium* and *Bacillus* Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **2004**, *68*, 373–402, doi:10.1128/MMBR.68.3.373-402.2004.
217. Chandrasekaran, R.; Lacy, D.B. The Role of Toxins in *Clostridium Difficile* Infection. *FEMS Microbiology Reviews* **2017**, *41*, 723–750, doi:10.1093/femsre/fux048.
218. Hasegawa, M.; Yamazaki, T.; Kamada, N.; Tawaratsumida, K.; Kim, Y.-G.; Núñez, G.; Inohara, N. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 Mediates Recognition of *Clostridium Difficile* and Induces Neutrophil Recruitment and Protection against the Pathogen. *J.I.* **2011**, *186*, 4872–4880, doi:10.4049/jimmunol.1003761.
219. Yoshino, Y.; Kitazawa, T.; Ikeda, M.; Tatsuno, K.; Yanagimoto, S.; Okugawa, S.; Yotsuyanagi, H.; Ota, Y. *Clostridium Difficile* Flagellin Stimulates Toll-like Receptor 5, and Toxin B Promotes Flagellin-Induced Chemokine Production via TLR5. *Life Sciences* **2013**, *92*, 211–217, doi:10.1016/j.lfs.2012.11.017.
220. Ryan, A.; Lynch, M.; Smith, S.M.; Amu, S.; Nel, H.J.; McCoy, C.E.; Dowling, J.K.; Draper, E.; O'Reilly, V.; McCarthy, C.; et al. A Role for TLR4 in *Clostridium Difficile* Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. *PLoS Pathog* **2011**, *7*, e1002076, doi:10.1371/journal.ppat.1002076.
221. Hing, T.C.; Ho, S.; Shih, D.Q.; Ichikawa, R.; Cheng, M.; Chen, J.; Chen, X.; Law, I.; Najarian, R.; Kelly, C.P.; et al. The Antimicrobial Peptide Cathelicidin Modulates *Clostridium Difficile* -Associated Colitis and Toxin A-Mediated Enteritis in Mice. *Gut* **2013**, *62*, 1295–1305, doi:10.1136/gutjnl-2012-302180.
222. Giesemann, T.; Guttenberg, G.; Aktories, K. Human α -Defensins Inhibit *Clostridium Difficile* Toxin B. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 2049–2058, doi:10.1053/j.gastro.2008.03.008.

223. Sunenshine, R.H.; McDonald, L.C. Clostridium Difficile-Associated Disease: New Challenges from an Established Pathogen. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* **2006**, *73*, 187–197, doi:10.3949/ccjm.73.2.187.
224. Shen, A. Clostridium Difficile Toxins: Mediators of Inflammation. *J Innate Immun* **2012**, *4*, 149–158, doi:10.1159/000332946.
225. Deakin, L.J.; Clare, S.; Fagan, R.P.; Dawson, L.F.; Pickard, D.J.; West, M.R.; Wren, B.W.; Fairweather, N.F.; Dougan, G.; Lawley, T.D. The Clostridium Difficile Spo0A Gene Is a Persistence and Transmission Factor. *Infect Immun* **2012**, *80*, 2704–2711, doi:10.1128/IAI.00147-12.
226. Freeman, J.; Bauer, M.P.; Baines, S.D.; Corver, J.; Fawley, W.N.; Goorhuis, B.; Kuijper, E.J.; Wilcox, M.H. The Changing Epidemiology of Clostridium Difficile Infections. *Clin Microbiol Rev* **2010**, *23*, 529–549, doi:10.1128/CMR.00082-09.
227. Lawley, T.D.; Clare, S.; Deakin, L.J.; Goulding, D.; Yen, J.L.; Raisen, C.; Brandt, C.; Lovell, J.; Cooke, F.; Clark, T.G.; et al. Use of Purified Clostridium Difficile Spores To Facilitate Evaluation of Health Care Disinfection Regimens. *Appl Environ Microbiol* **2010**, *76*, 6895–6900, doi:10.1128/AEM.00718-10.
228. Maillard, J.-Y. Innate Resistance to Sporicides and Potential Failure to Decontaminate. *Journal of Hospital Infection* **2011**, *77*, 204–209, doi:10.1016/j.jhin.2010.06.028.
229. Baines, S.D.; O'Connor, R.; Saxton, K.; Freeman, J.; Wilcox, M.H. Activity of Vancomycin against Epidemic Clostridium Difficile Strains in a Human Gut Model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2009**, *63*, 520–525, doi:10.1093/jac/dkn502.
230. Paredes-Sabja, D.; Sarker, M.R. Interactions between Clostridium Perfringens Spores and Raw 264.7 Macrophages. *Anaerobe* **2012**, *18*, 148–156, doi:10.1016/j.anaerobe.2011.12.019.
231. Al-Hinai, M.A.; Jones, S.W.; Papoutsakis, E.T. The Clostridium Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **2015**, *79*, 19–37, doi:10.1128/MMBR.00025-14.
232. Lawley, T.D.; Clare, S.; Walker, A.W.; Goulding, D.; Stabler, R.A.; Croucher, N.; Mastroeni, P.; Scott, P.; Raisen, C.; Mottram, L.; et al. Antibiotic Treatment of Clostridium Difficile Carrier Mice Triggers a Supershedder State, Spore-Mediated Transmission, and Severe Disease in Immunocompromised Hosts. *Infect Immun* **2009**, *77*, 3661–3669, doi:10.1128/IAI.00558-09.
233. Higgins, D.; Dworkin, J. Recent Progress in Bacillus Subtilis Sporulation. *FEMS Microbiol Rev* **2012**, *36*, 131–148, doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.
234. Popham, D.L.; Helin, J.; Costello, C.E.; Setlow, P. Muramic Lactam in Peptidoglycan of Bacillus Subtilis Spores Is Required for Spore Outgrowth but Not for Spore Dehydration or Heat Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 15405–15410, doi:10.1073/pnas.93.26.15405.
235. Lawley, T.D.; Croucher, N.J.; Yu, L.; Clare, S.; Sebahia, M.; Goulding, D.; Pickard, D.J.; Parkhill, J.; Choudhary, J.; Dougan, G. Proteomic and Genomic Characterization of Highly Infectious Clostridium Difficile 630 Spores. *J Bacteriol* **2009**, *191*, 5377–5386, doi:10.1128/JB.00597-09.
236. Leski, T.A.; Caswell, C.C.; Pawlowski, M.; Klinke, D.J.; Bujnicki, J.M.; Hart, S.J.; Lukomski, S. Identification and Classification of Bcl Genes and Proteins of Bacillus Cereus Group Organisms and Their Application in Bacillus Anthracis Detection and Fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* **2009**, *75*, 7163–7172, doi:10.1128/AEM.01069-09.
237. Hodgkiss, W.; Ordal, Z.J.; Cann, D.C. The Morphology and Ultrastructure of the Spore and Exosporium of Some Clostridium Species. *Journal of General Microbiology* **1967**, *47*, 213–225, doi:10.1099/00221287-47-2-213.
238. Barra-Carrasco, J.; Olguin-Araneda, V.; Plaza-Garrido, A.; Miranda-Cardenas, C.; Cofre-Araneda, G.; Pizarro-Guajardo, M.; Sarker, M.R.; Paredes-Sabja, D. The Clostridium Difficile Exosporium Cysteine (CdeC)-Rich Protein Is Required for Exosporium Morphogenesis and Coat Assembly. *Journal of Bacteriology* **2013**, *195*, 3863–3875, doi:10.1128/JB.00369-13.
239. Sylvestre, P.; Couture-Tosi, E.; Mock, M. A Collagen-like Surface Glycoprotein Is a Structural Component of the Bacillus Anthracis Exosporium. *Mol Microbiol* **2002**, *45*, 169–178, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.03000.x.
240. Bozue, J.; Moody, K.L.; Cote, C.K.; Stiles, B.G.; Friedlander, A.M.; Welkos, S.L.; Hale, M.L. Bacillus Anthracis Spores of the BclA Mutant Exhibit Increased Adherence to Epithelial Cells,

- Fibroblasts, and Endothelial Cells but Not to Macrophages. *Infect Immun* **2007**, *75*, 4498–4505, doi:10.1128/IAI.00434-07.
241. Paredes-Sabja, D.; Sarker, M.R. Adherence of *Clostridium Difficile* Spores to Caco-2 Cells in Culture. *Journal of Medical Microbiology* **2012**, *61*, 1208–1218, doi:10.1099/jmm.0.043687-0.
 242. Sebahia, M.; Wren, B.W.; Mullany, P.; Fairweather, N.F.; Minton, N.; Stabler, R.; Thomson, N.R.; Roberts, A.P.; Cerdeño-Tárraga, A.M.; Wang, H.; et al. The Multidrug-Resistant Human Pathogen *Clostridium Difficile* Has a Highly Mobile, Mosaic Genome. *Nat Genet* **2006**, *38*, 779–786, doi:10.1038/ng1830.
 243. Permpoonpattana, P.; Phetcharaburanin, J.; Mikelson, A.; Dembek, M.; Tan, S.; Brisson, M.-C.; La Ragione, R.; Brisson, A.R.; Fairweather, N.; Hong, H.A.; et al. Functional Characterization of *Clostridium Difficile* Spore Coat Proteins. *J Bacteriol* **2013**, *195*, 1492–1503, doi:10.1128/JB.02104-12.
 244. Putnam, E.E.; Nock, A.M.; Lawley, T.D.; Shen, A. SpoIVA and SipL Are *Clostridium Difficile* Spore Morphogenetic Proteins. *Journal of Bacteriology* **2013**, *195*, 1214–1225, doi:10.1128/JB.02181-12.
 245. Abhyankar, W.; Hossain, A.H.; Djajasaputra, A.; Permpoonpattana, P.; Ter Beek, A.; Dekker, H.L.; Cutting, S.M.; Brul, S.; de Koning, L.J.; de Koster, C.G. In Pursuit of Protein Targets: Proteomic Characterization of Bacterial Spore Outer Layers. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 4507–4521, doi:10.1021/pr4005629.
 246. Steiner, E.; Dago, A.E.; Young, D.I.; Heap, J.T.; Minton, N.P.; Hoch, J.A.; Young, M. Multiple Orphan Histidine Kinases Interact Directly with Spo0A to Control the Initiation of Endospore Formation in *Clostridium Acetobutylicum*: Sporulation Initiation in Clostridia. *Molecular Microbiology* **2011**, *80*, 641–654, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07608.x.
 247. Heap, J.T.; Pennington, O.J.; Cartman, S.T.; Carter, G.P.; Minton, N.P. The Clostron: A Universal Gene Knock-out System for the Genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods* **2007**, *70*, 452–464, doi:10.1016/j.mimet.2007.05.021.
 248. Wilson, K.H. Efficiency of Various Bile Salt Preparations for Stimulation of *Clostridium Difficile* Spore Germination. *J Clin Microbiol* **1983**, *18*, 1017–1019, doi:10.1128/jcm.18.4.1017-1019.1983.
 249. Heeg, D.; Burns, D.A.; Cartman, S.T.; Minton, N.P. Spores of *Clostridium Difficile* Clinical Isolates Display a Diverse Germination Response to Bile Salts. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32381, doi:10.1371/journal.pone.0032381.
 250. Francis, O.; Han, F.; Adams, J.C. Correction: Molecular Phylogeny of a RING E3 Ubiquitin Ligase, Conserved in Eukaryotic Cells and Dominated by Homologous Components, the Muskelein/RanBPM/CTLH Complex. *PLoS ONE* **2013**, *8*, doi:10.1371/annotation/1e464689-3c86-4399-b229-1e00d65593a5.
 251. Naaber, P.; Lehto, E.; Salminen, S.; Mikelsaar, M. Inhibition of Adhesion of *Clostridium Difficile* to Caco-2 Cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1996**, *14*, 205–209, doi:10.1111/j.1574-695X.1996.tb00288.x.
 252. O’Farrelly, C.; Baird, A.; Drudy, D.; Fenelon, L.; O’Donoghue, D.P. Flow Cytometric Analysis of *Clostridium Difficile* Adherence to Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Medical Microbiology* **2001**, *50*, 526–534, doi:10.1099/0022-1317-50-6-526.
 253. Karjalainen, T.; Barc, M.C.; Collignon, A.; Trollé, S.; Boureau, H.; Cotte-Laffitte, J.; Bourlioux, P. Cloning of a Genetic Determinant from *Clostridium Difficile* Involved in Adherence to Tissue Culture Cells and Mucus. *Infect Immun* **1994**, *62*, 4347–4355, doi:10.1128/iai.62.10.4347-4355.1994.
 254. Cerquetti, M.; Serafino, A.; Sebastianelli, A.; Mastrantonio, P. Binding of *Clostridium Difficile* to Caco-2 Epithelial Cell Line and to Extracellular Matrix Proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **2002**, *32*, 211–218, doi:10.1111/j.1574-695X.2002.tb00556.x.
 255. Joshi, L.T.; Phillips, D.S.; Williams, C.F.; Alyousef, A.; Baillie, L. Contribution of Spores to the Ability of *Clostridium Difficile* To Adhere to Surfaces. *Appl Environ Microbiol* **2012**, *78*, 7671–7679, doi:10.1128/AEM.01862-12.
 256. Sebahia, M.; Peck, M.W.; Minton, N.P.; Thomson, N.R.; Holden, M.T.G.; Mitchell, W.J.; Carter, A.T.; Bentley, S.D.; Mason, D.R.; Crossman, L.; et al. Genome Sequence of a Proteolytic (Group

- D) *Clostridium Botulinum* Strain Hall A and Comparative Analysis of the Clostridial Genomes. *Genome Res.* **2007**, *17*, 1082–1092, doi:10.1101/gr.6282807.
257. Fagan, R.P.; Janoir, C.; Collignon, A.; Mastrantonio, P.; Poxton, I.R.; Fairweather, N.F. A Proposed Nomenclature for Cell Wall Proteins of *Clostridium Difficile*. *Journal of Medical Microbiology* **2011**, *60*, 1225–1228, doi:10.1099/jmm.0.028472-0.
 258. Karjalainen, T.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Cerquetti, M.; Spigaglia, P.; Maggioni, A.; Mauri, P.; Mastrantonio, P. Molecular and Genomic Analysis of Genes Encoding Surface-Anchored Proteins from *Clostridium Difficile*. *Infect Immun* **2001**, *69*, 3442–3446, doi:10.1128/IAI.69.5.3442-3446.2001.
 259. Denève, C.; Janoir, C.; Poilane, I.; Fantinato, C.; Collignon, A. New Trends in *Clostridium Difficile* Virulence and Pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2009**, *33*, S24–S28, doi:10.1016/S0924-8579(09)70012-3.
 260. Calabi, E.; Fairweather, N. Patterns of Sequence Conservation in the S-Layer Proteins and Related Sequences in *Clostridium Difficile*. *J Bacteriol* **2002**, *184*, 3886–3897, doi:10.1128/JB.184.14.3886-3897.2002.
 261. Janoir, C. Virulence Factors of *Clostridium Difficile* and Their Role during Infection. *Anaerobe* **2016**, *37*, 13–24, doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.009.
 262. de la Riva, L.; Willing, S.E.; Tate, E.W.; Fairweather, N.F. Roles of Cysteine Proteases Cwp84 and Cwp13 in Biogenesis of the Cell Wall of *Clostridium Difficile*. *J Bacteriol* **2011**, *193*, 3276–3285, doi:10.1128/JB.00248-11.
 263. ChapetónMontes, D.; Candela, T.; Collignon, A.; Janoir, C. Localization of the *Clostridium Difficile* Cysteine Protease Cwp84 and Insights into Its Maturation Process. *J Bacteriol* **2011**, *193*, 5314–5321, doi:10.1128/JB.00326-11.
 264. Péchiné, S.; Janoir, C.; Collignon, A. Variability of *Clostridium Difficile* Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with *Clostridium Difficile* -Associated Disease. *J Clin Microbiol* **2005**, *43*, 5018–5025, doi:10.1128/JCM.43.10.5018-5025.2005.
 265. Savariau-Lacomme, M.-P.; Lebarbier, C.; Karjalainen, T.; Collignon, A.; Janoir, C. Transcription and Analysis of Polymorphism in a Cluster of Genes Encoding Surface-Associated Proteins of *Clostridium Difficile*. *J Bacteriol* **2003**, *185*, 4461–4470, doi:10.1128/JB.185.15.4461-4470.2003.
 266. Emerson, J.E.; Reynolds, C.B.; Fagan, R.P.; Shaw, H.A.; Goulding, D.; Fairweather, N.F. A Novel Genetic Switch Controls Phase Variable Expression of CwpV, a *Clostridium Difficile* Cell Wall Protein. *Molecular Microbiology* **2009**, *74*, 541–556, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06812.x.
 267. Reynolds, C.B.; Emerson, J.E.; de la Riva, L.; Fagan, R.P.; Fairweather, N.F. The *Clostridium Difficile* Cell Wall Protein CwpV Is Antigenically Variable between Strains, but Exhibits Conserved Aggregation-Promoting Function. *PLoS Pathog* **2011**, *7*, e1002024, doi:10.1371/journal.ppat.1002024.
 268. Sára, M.; Sleytr, U.B. S-Layer Proteins. *J Bacteriol* **2000**, *182*, 859–868, doi:10.1128/JB.182.4.859-868.2000.
 269. Dembek, M.; Barquist, L.; Boinett, C.J.; Cain, A.K.; Mayho, M.; Lawley, T.D.; Fairweather, N.F.; Fagan, R.P. High-Throughput Analysis of Gene Essentiality and Sporulation in *Clostridium Difficile*. *mBio* **2015**, *6*, e02383-14, doi:10.1128/mBio.02383-14.
 270. Cerquetti, M.; Molinari, A.; Sebastianelli, A.; Diociaiuti, M.; Petruzzelli, R.; Capo, C.; Mastrantonio, P. Characterization of Surface Layer Proteins from Different *Clostridium Difficile* Clinical Isolates. *Microbial Pathogenesis* **2000**, *28*, 363–372, doi:10.1006/mpat.2000.0356.
 271. Calabi, E.; Ward, S.; Wren, B.; Paxton, T.; Panico, M.; Morris, H.; Dell, A.; Dougan, G.; Fairweather, N. Molecular Characterization of the Surface Layer Proteins from *Clostridium Difficile*. *Mol Microbiol* **2001**, *40*, 1187–1199, doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02461.x.
 272. Fagan, R.P.; Albesa-Jové, D.; Qazi, O.; Svergun, D.I.; Brown, K.A.; Fairweather, N.F. Structural Insights into the Molecular Organization of the S-Layer from *Clostridium Difficile*. *Molecular Microbiology* **2009**, *71*, 1308–1322, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06603.x.
 273. Takeoka, A.; Takumi, K.; Koga, T.; Kawata, T. Purification and Characterization of S Layer Proteins from *Clostridium Difficile* GAI 0714. *Microbiology* **1991**, *137*, 261–267, doi:10.1099/00221287-137-2-261.
 274. Bianco, M.; Fedele, G.; Quattrini, A.; Spigaglia, P.; Barbanti, F.; Mastrantonio, P.; Ausiello, C.M. Immunomodulatory Activities of Surface-Layer Proteins Obtained from Epidemic and

- Hypervirulent *Clostridium Difficile* Strains. *Journal of Medical Microbiology* **2011**, *60*, 1162–1167, doi:10.1099/jmm.0.029694-0.
275. Vedantam, G.; Clark, A.; Chu, M.; McQuade, R.; Mallozzi, M.; Viswanathan, V.K. Clostridium Difficile Infection: Toxins and Non-Toxin Virulence Factors, and Their Contributions to Disease Establishment and Host Response. *Gut Microbes* **2012**, *3*, 121–134, doi:10.4161/gmic.19399.
 276. Reid, C.W.; Vinogradov, E.; Li, J.; Jarrell, H.C.; Logan, S.M.; Brisson, J.-R. Structural Characterization of Surface Glycans from *Clostridium Difficile*. *Carbohydrate Research* **2012**, *354*, 65–73, doi:10.1016/j.carres.2012.02.002.
 277. Barketi-Klai, A.; Hoys, S.; Lambert-Bordes, S.; Collignon, A.; Kansau, I. Role of Fibronectin-Binding Protein A in *Clostridium Difficile* Intestinal Colonization. *Journal of Medical Microbiology* **2011**, *60*, 1155–1161, doi:10.1099/jmm.0.029553-0.
 278. Lin, Y.-P.; Kuo, C.-J.; Koleci, X.; McDonough, S.P.; Chang, Y.-F. Manganese Binds to *Clostridium Difficile* Fbp68 and Is Essential for Fibronectin Binding. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 3957–3969, doi:10.1074/jbc.M110.184523.
 279. Tulli, L.; Marchi, S.; Petracca, R.; Shaw, H.A.; Fairweather, N.F.; Scarselli, M.; Soriani, M.; Leuzzi, R. CbpA: A Novel Surface Exposed Adhesin of *Clostridium Difficile* Targeting Human Collagen: Collagen Binding Protein of *Clostridium Difficile*. *Cell Microbiol* **2013**, n/a-n/a, doi:10.1111/cmi.12139.
 280. Donahue, E.H.; Dawson, L.F.; Valiente, E.; Firth-Clark, S.; Major, M.R.; Littler, E.; Perrior, T.R.; Wren, B.W. Clostridium Difficile has a Single Sortase, SrtB, That Can Be Inhibited by Small-Molecule Inhibitors. *BMC Microbiol* **2014**, *14*, 219, doi:10.1186/s12866-014-0219-1.
 281. Cafardi, V.; Biagini, M.; Martinelli, M.; Leuzzi, R.; Rubino, J.T.; Cantini, F.; Norais, N.; Scarselli, M.; Serruto, D.; Unnikrishnan, M. Identification of a Novel Zinc Metalloprotease through a Global Analysis of *Clostridium Difficile* Extracellular Proteins. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81306, doi:10.1371/journal.pone.0081306.
 282. Duesbery, N.S.; Webb, C.P.; Leppla, S.H.; Gordon, V.M.; Klimpel, K.R.; Copeland, T.D.; Ahn, N.G.; Oskarsson, M.K.; Fukasawa, K.; Paull, K.D.; et al. Proteolytic Inactivation of MAP-Kinase-Kinase by Anthrax Lethal Factor. *Science* **1998**, *280*, 734–737, doi:10.1126/science.280.5364.734.
 283. Hennequin, C.; Collignon, A.; Karjalainen, T. Analysis of Expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium Difficile* in Response to Stress. *Microbial Pathogenesis* **2001**, *31*, 255–260, doi:10.1006/mpat.2001.0468.
 284. Péchiné, S.; Hennequin, C.; Boursier, C.; Hoys, S.; Collignon, A. Immunization Using GroEL Decreases *Clostridium Difficile* Intestinal Colonization. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81112, doi:10.1371/journal.pone.0081112.
 285. Harshey, R.M. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 249–273, doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.091014.
 286. Duan, Q.; Zhou, M.; Zhu, L.; Zhu, G. Flagella and Bacterial Pathogenicity: Flagella and Bacterial Pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* **2013**, *53*, 1–8, doi:10.1002/jobm.201100335.
 287. Macnab, R.M. How Bacteria Assemble Flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 77–100, doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090832.
 288. Twine, S.M.; Reid, C.W.; Aubry, A.; McMullin, D.R.; Fulton, K.M.; Austin, J.; Logan, S.M. Motility and Flagellar Glycosylation in *Clostridium Difficile*. *J Bacteriol* **2009**, *191*, 7050–7062, doi:10.1128/JB.00861-09.
 289. KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. URL: <https://www.genome.jp/pathway/Map02040>;
 290. Terashima, H.; Kawamoto, A.; Tatsumi, C.; Namba, K.; Minamino, T.; Imada, K. In Vitro Reconstitution of Functional Type III Protein Export and Insights into Flagellar Assembly. *mBio* **2018**, *9*, e00988-18, doi:10.1128/mBio.00988-18.
 291. Batah, J.; Denève-Larrazet, C.; Jolivot, P.-A.; Kuehne, S.; Collignon, A.; Marvaud, J.-C.; Kansau, I. Clostridium Difficile Flagella Predominantly Activate TLR5-Linked NF-KB Pathway in Epithelial Cells. *Anaerobe* **2016**, *38*, 116–124, doi:10.1016/j.anaerobe.2016.01.002.
 292. Nachamkin, I.; Yang, X.H.; Stern, N.J. Role of Campylobacter Jejuni Flagella as Colonization Factors for Three-Day-Old Chicks: Analysis with Flagellar Mutants. *Appl Environ Microbiol* **1993**, *59*, 1269–1273, doi:10.1128/aem.59.5.1269-1273.1993.

293. Richardson, K. Roles of Motility and Flagellar Structure in Pathogenicity of *Vibrio Cholerae*: Analysis of Motility Mutants in Three Animal Models. *Infect Immun* **1991**, *59*, 2727–2736, doi:10.1128/iai.59.8.2727-2736.1991.
294. Dunne, C. Factors That Mediate Colonization of the Human Stomach by *Helicobacter Pylori*. *WJG* **2014**, *20*, 5610, doi:10.3748/wjg.v20.i19.5610.
295. Postnova, T.; Gomez-Duarte, O.G.; Richardson, K. Motility Mutants of *Vibrio Cholerae* 01 Have Reduced Adherence in Vitro to Human Small Intestinal Epithelial Cells as Demonstrated by ELISA. *Microbiology* **1996**, *142*, 2767–2776, doi:10.1099/13500872-142-10-2767.
296. Tasteyre, A.; Barc, M.-C.; Collignon, A.; Boureau, H.; Karjalainen, T. Role of FliC and FliD Flagellar Proteins of *Clostridium Difficile* in Adherence and Gut Colonization. *Infect Immun* **2001**, *69*, 7937–7940, doi:10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001.
297. Aubry, A.; Hussack, G.; Chen, W.; KuoLee, R.; Twine, S.M.; Fulton, K.M.; Foote, S.; Carrillo, C.D.; Tanha, J.; Logan, S.M. Modulation of Toxin Production by the Flagellar Regulon in *Clostridium Difficile*. *Infect Immun* **2012**, *80*, 3521–3532, doi:10.1128/IAI.00224-12.
298. Baban, S.T.; Kuehne, S.A.; Barketi-Klai, A.; Cartman, S.T.; Kelly, M.L.; Hardie, K.R.; Kansau, I.; Collignon, A.; Minton, N.P. The Role of Flagella in *Clostridium Difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73026, doi:10.1371/journal.pone.0073026.
299. Samatey, F.A.; Imada, K.; Nagashima, S.; Vonderviszt, F.; Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; Namba, K. Structure of the Bacterial Flagellar Protofilament and Implications for a Switch for Supercoiling. *Nature* **2001**, *410*, 331–337, doi:10.1038/35066504.
300. Mimori-Kiyosue, Y.; Vonderviszt, F.; Namba, K. Locations of Terminal Segments of Flagellin in the Filament Structure and Their Roles in Polymerization and Polymorphism¹¹ Edited by M. F. Moody. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *270*, 222–237, doi:https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1111.
301. Yonekura, K.; Maki-Yonekura, S.; Namba, K. Complete Atomic Model of the Bacterial Flagellar Filament by Electron Cryomicroscopy. *Nature* **2003**, *424*, 643–650, doi:10.1038/nature01830.
302. Nempont, C.; Cayet, D.; Rumbo, M.; Bompard, C.; Villeret, V.; Sirard, J.-C. Deletion of Flagellin's Hypervariable Region Abrogates Antibody-Mediated Neutralization and Systemic Activation of TLR5-Dependent Immunity. *The Journal of Immunology* **2008**, *181*, 2036–2043, doi:10.4049/jimmunol.181.3.2036.
303. Liu, F.; Yang, J.; Zhang, Y.; Zhou, D.; Chen, Y.; Gai, W.; Shi, W.; Li, Q.; Tien, P.; Yan, H. Recombinant Flagellins with Partial Deletions of the Hypervariable Domain Lose Antigenicity but Not Mucosal Adjuvancy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *392*, 582–587, doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.077.
304. Anjuwon-Foster, B.R.; Tamayo, R. Phase Variation of *Clostridium Difficile* Virulence Factors. *Gut Microbes* **2018**, *9*, 76–83, doi:10.1080/19490976.2017.1362526.
305. Tasteyre, A.; Karjalainen, T.; Avesani, V.; Delmée, M.; Collignon, A.; Bourlioux, P.; Barc, M.-C. Phenotypic and Genotypic Diversity of the Flagellin Gene (FliC) among *Clostridium Difficile* Isolates from Different Serogroups. *Journal of Clinical Microbiology* **2000**, *38*, 3179–3186, doi:10.1128/JCM.38.9.3179-3186.2000.
306. Tasteyre, A.; Karjalainen, T.; Avesani, V.; Delmée, M.; Collignon, A.; Bourlioux, P.; Barc, M.-C. Molecular Characterization of *FliD* Gene Encoding Flagellar Cap and Its Expression among *Clostridium Difficile* Isolates from Different Serogroups. *J Clin Microbiol* **2001**, *39*, 1178–1183, doi:10.1128/JCM.39.3.1178-1183.2001.
307. Faulds-Pain, A.; Twine, S.M.; Vinogradov, E.; Strong, P.C.R.; Dell, A.; Buckley, A.M.; Douce, G.R.; Valiente, E.; Logan, S.M.; Wren, B.W. The Post-translational Modification of the *Clostridium Difficile* Flagellin Affects Motility, Cell Surface Properties and Virulence. *Molecular Microbiology* **2014**, *94*, 272–289, doi:10.1111/mmi.12755.
308. Valiente, E.; Dawson, L.F.; Cairns, M.D.; Stabler, R.A.; Wren, B.W. Emergence of New PCR Ribotypes from the Hypervirulent *Clostridium Difficile* 027 Lineage. *Journal of Medical Microbiology* **2012**, *61*, 49–56, doi:10.1099/jmm.0.036194-0.
309. Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajandream, M.-A.; Barrell, B. Artemis: Sequence Visualization and Annotation. *Bioinformatics* **2000**, *16*, 944–945, doi:10.1093/bioinformatics/16.10.944.

310. Heap, J.T.; Ehsaan, M.; Cooksley, C.M.; Ng, Y.-K.; Cartman, S.T.; Winzer, K.; Minton, N.P. Integration of DNA into Bacterial Chromosomes from Plasmids without a Counter-Selection Marker. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, e59–e59, doi:10.1093/nar/gkr1321.
311. Ng, Y.K.; Ehsaan, M.; Philip, S.; Collery, M.M.; Janoir, C.; Collignon, A.; Cartman, S.T.; Minton, N.P. Expanding the Repertoire of Gene Tools for Precise Manipulation of the *Clostridium Difficile* Genome: Allelic Exchange Using PyrE Alleles. *PLOS ONE* **2013**, *8*, 1–13, doi:10.1371/journal.pone.0056051.
312. Thapa, T.; Leuzzi, R.; Ng, Y.K.; Baban, S.T.; Adamo, R.; Kuehne, S.A.; Scarselli, M.; Minton, N.P.; Serruto, D.; Unnikrishnan, M. Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium Difficile*. *Journal of Bacteriology* **2013**, *195*, 545–555, doi:10.1128/JB.01980-12.
313. Goorhuis, A.; Debast, S.B.; van Leengoed, L.A.M.G.; Harmanus, C.; Notermans, D.W.; Bergwerff, A.A.; Kuijper, E.J. *Clostridium Difficile* PCR Ribotype 078: An Emerging Strain in Humans and in Pigs? *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 1157–1158, doi:10.1128/JCM.01536-07.
314. Schneeberg, A.; Neubauer, H.; Schmoock, G.; Grossmann, E.; Seyboldt, C. Presence of *Clostridium Difficile* PCR Ribotype Clusters Related to 033, 078 and 045 in Diarrhoeic Calves in Germany. *Journal of Medical Microbiology* **2013**, *62*, 1190–1198, doi:10.1099/jmm.0.056473-0.
315. Cairns, M.D.; Stabler, R.A.; Shetty, N.; Wren, B.W. The Continually Evolving *Clostridium Difficile* Species. *Future Microbiology* **2012**, *7*, 945–957, doi:10.2217/fmb.12.73.
316. Carter, G.P.; Rood, J.I.; Lyras, D. The Role of Toxin A and Toxin B in the Virulence of *Clostridium Difficile*. *Trends in Microbiology* **2012**, *20*, 21–29, doi:10.1016/j.tim.2011.11.003.
317. Braun, V.; Hundsberger, T.; Leukel, P.; Sauerborn, M.; von Eichel-Streiber, C. Definition of the Single Integration Site of the Pathogenicity Locus in *Clostridium Difficile*. *Gene* **1996**, *181*, 29–38, doi:10.1016/S0378-1119(96)00398-8.
318. Mani, N.; Dupuy, B. Regulation of Toxin Synthesis in *Clostridium Difficile* by an Alternative RNA Polymerase Sigma Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 5844–5849, doi:10.1073/pnas.101126598.
319. Carter, G.P.; Douce, G.R.; Govind, R.; Howarth, P.M.; Mackin, K.E.; Spencer, J.; Buckley, A.M.; Antunes, A.; Kotsanas, D.; Jenkin, G.A.; et al. The Anti-Sigma Factor TcdC Modulates Hypervirulence in an Epidemic BI/NAP1/027 Clinical Isolate of *Clostridium Difficile*. *PLoS Pathog* **2011**, *7*, e1002317, doi:10.1371/journal.ppat.1002317.
320. Govind, R.; Dupuy, B. Secretion of *Clostridium Difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLoS Pathog* **2012**, *8*, e1002727, doi:10.1371/journal.ppat.1002727.
321. Janezic, S.; Marín, M.; Martín, A.; Rupnik, M. A New Type of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive *Clostridium Difficile* Strain Lacking a Complete *TcdA* Gene. *J Clin Microbiol* **2015**, *53*, 692–695, doi:10.1128/JCM.02211-14.
322. Mani, N.; Lyras, D.; Barroso, L.; Howarth, P.; Wilkins, T.; Rood, J.I.; Sonenshein, A.L.; Dupuy, B. Environmental Response and Autoregulation of *Clostridium Difficile* TxeR, a Sigma Factor for Toxin Gene Expression. *J Bacteriol* **2002**, *184*, 5971–5978, doi:10.1128/JB.184.21.5971-5978.2002.
323. Matamouros, S.; England, P.; Dupuy, B. *Clostridium Difficile* Toxin Expression Is Inhibited by the Novel Regulator TcdC: TcdC Inhibits *C. Difficile* Toxin Expression. *Molecular Microbiology* **2007**, *64*, 1274–1288, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05739.x.
324. Cartman, S.T.; Kelly, M.L.; Heeg, D.; Heap, J.T.; Minton, N.P. Precise Manipulation of the *Clostridium Difficile* Chromosome Reveals a Lack of Association between the *TcdC* Genotype and Toxin Production. *Appl Environ Microbiol* **2012**, *78*, 4683–4690, doi:10.1128/AEM.00249-12.
325. Bakker, D.; Smits, W.K.; Kuijper, E.J.; Corver, J. TcdC Does Not Significantly Repress Toxin Expression in *Clostridium Difficile* 630ΔErm. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43247, doi:10.1371/journal.pone.0043247.
326. Olling, A.; Seehase, S.; Minton, N.P.; Tatge, H.; Schröter, S.; Kohlschein, S.; Pich, A.; Just, I.; Gerhard, R. Release of TcdA and TcdB from *Clostridium Difficile* Cdi 630 Is Not Affected by Functional Inactivation of the TcdE Gene. *Microbial Pathogenesis* **2012**, *52*, 92–100, doi:10.1016/j.micpath.2011.10.009.

327. Bouillaut, L.; Dubois, T.; Sonenshein, A.L.; Dupuy, B. Integration of Metabolism and Virulence in *Clostridium Difficile*. *Research in Microbiology* **2015**, *166*, 375–383, doi:10.1016/j.resmic.2014.10.002.
328. Janoir, C.; Denève, C.; Bouttier, S.; Barbut, F.; Hoys, S.; Caleechum, L.; Chapetón-Montes, D.; Pereira, F.C.; Henriques, A.O.; Collignon, A.; et al. Adaptive Strategies and Pathogenesis of *Clostridium Difficile* from *In Vivo* Transcriptomics. *Infect Immun* **2013**, *81*, 3757–3769, doi:10.1128/IAI.00515-13.
329. Hammond, G.A.; Johnson, J.L. The Toxigenic Element of *Clostridium Difficile* Strain VPI 10463. *Microbial Pathogenesis* **1995**, *19*, 203–213, doi:10.1016/S0882-4010(95)90263-5.
330. Cohen, S.H.; Tang, Y.J.; Silva, Jr., J. Analysis of the Pathogenicity Locus in *Clostridium Difficile* Strains. *J INFECT DIS* **2000**, *181*, 659–663, doi:10.1086/315248.
331. Brouwer, M.S.M.; Roberts, A.P.; Hussain, H.; Williams, R.J.; Allan, E.; Mullany, P. Horizontal Gene Transfer Converts Non-Toxigenic *Clostridium Difficile* Strains into Toxin Producers. *Nat Commun* **2013**, *4*, 2601, doi:10.1038/ncomms3601.
332. von Eichel-Streiber, C.; Laufenberg-Feldmann, R.; Saringen, S.; Schulze, J.; Sauerborn, M. Comparative Sequence Analysis of The *Clostridium Difficile* Toxins A and B. *Molec. Gen. Genet.* **1992**, *233*, 260–268, doi:10.1007/BF00587587.
333. Aktories, K. Bacterial Protein Toxins That Modify Host Regulatory GTPases. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9*, 487–498, doi:10.1038/nrmicro2592.
334. Jank, T.; Aktories, K. Structure and Mode of Action of Clostridial Glucosylating Toxins: The ABCD Model. *Trends in Microbiology* **2008**, *16*, 222–229, doi:10.1016/j.tim.2008.01.011.
335. Reinert, D.J.; Jank, T.; Aktories, K.; Schulz, G.E. Structural Basis for the Function of *Clostridium Difficile* Toxin B. *Journal of Molecular Biology* **2005**, *351*, 973–981, doi:10.1016/j.jmb.2005.06.071.
336. Genth, H.; Dreger, S.C.; Huelsenbeck, J.; Just, I. *Clostridium Difficile* Toxins: More than Mere Inhibitors of Rho Proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2008**, *40*, 592–597, doi:10.1016/j.biocel.2007.12.014.
337. Shen, A.; Lupardus, P.J.; Gersch, M.M.; Puri, A.W.; Albrow, V.E.; Garcia, K.C.; Bogoy, M. Defining an Allosteric Circuit in the Cysteine Protease Domain of *Clostridium Difficile* Toxins. *Nat Struct Mol Biol* **2011**, *18*, 364–371, doi:10.1038/nsmb.1990.
338. Schöttelndreier, D.; Langejürgen, A.; Lindner, R.; Genth, H. Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Is Involved in the Uptake of *Clostridioides Difficile* Toxin A and Serves as an Internalizing Receptor. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 565465, doi:10.3389/fcimb.2020.565465.
339. Tao, L.; Tian, S.; Zhang, J.; Liu, Z.; Robinson-McCarthy, L.; Miyashita, S.-I.; Breault, D.T.; Gerhard, R.; Ottamasathien, S.; Whelan, S.P.J.; et al. Sulfated Glycosaminoglycans and Low-Density Lipoprotein Receptor Contribute to *Clostridium Difficile* Toxin A Entry into Cells. *Nat Microbiol* **2019**, *4*, 1760–1769, doi:10.1038/s41564-019-0464-z.
340. LaFrance, M.E.; Farrow, M.A.; Chandrasekaran, R.; Sheng, J.; Rubin, D.H.; Lacy, D.B. Identification of an Epithelial Cell Receptor Responsible for *Clostridium Difficile* TcdB-Induced Cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 7073–7078, doi:10.1073/pnas.1500791112.
341. Yuan, P.; Zhang, H.; Cai, C.; Zhu, S.; Zhou, Y.; Yang, X.; He, R.; Li, C.; Guo, S.; Li, S.; et al. Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 Functions as the Cellular Receptor for *Clostridium Difficile* Toxin B. *Cell Res* **2015**, *25*, 157–168, doi:10.1038/cr.2014.169.
342. Terada, N.; Ohno, N.; Murata, S.; Katoh, R.; Stallcup, W.B.; Ohno, S. Immunohistochemical Study of NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan Expression in the Small and Large Intestines. *Histochem Cell Biol* **2006**, *126*, 483–490, doi:10.1007/s00418-006-0184-3.
343. Chen, P.; Tao, L.; Wang, T.; Zhang, J.; He, A.; Lam, K.; Liu, Z.; He, X.; Perry, K.; Dong, M.; et al. Structural Basis for Recognition of Frizzled Proteins by *Clostridium Difficile* Toxin B. *Science* **2018**, *360*, 664–669, doi:10.1126/science.aar1999.
344. Papatheodorou, P.; Zamboglou, C.; Genisyurek, S.; Guttenberg, G.; Aktories, K. Clostridial Glucosylating Toxins Enter Cells via Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10673, doi:10.1371/journal.pone.0010673.

345. Pruitt, R.N.; Chambers, M.G.; Ng, K.K.-S.; Ohi, M.D.; Lacy, D.B. Structural Organization of the Functional Domains of *Clostridium Difficile* Toxins A and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 13467–13472, doi:10.1073/pnas.1002199107.
346. Egerer, M.; Giesemann, T.; Herrmann, C.; Aktories, K. Autocatalytic Processing of Clostridium Difficile Toxin B. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 3389–3395, doi:10.1074/jbc.M806002200.
347. Pruitt, R.N.; Chagot, B.; Cover, M.; Chazin, W.J.; Spiller, B.; Lacy, D.B. Structure-Function Analysis of Inositol Hexakisphosphate-Induced Autoprocessing in Clostridium Difficile Toxin A. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 21934–21940, doi:10.1074/jbc.M109.018929.
348. Jank, T.; Giesemann, T.; Aktories, K. Rho-Glucosylating Clostridium Difficile Toxins A and B: New Insights into Structure and Function. *Glycobiology* **2007**, *17*, 15R–22R, doi:10.1093/glycob/cwm004.
349. Gerhard, R.; Nottrott, S.; Schoentaube, J.; Tatge, H.; Olling, A.; Just, I. Glucosylation of Rho GTPases by Clostridium Difficile Toxin A Triggers Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Medical Microbiology* **2008**, *57*, 765–770, doi:10.1099/jmm.0.47769-0.
350. Lanis, J.M.; Barua, S.; Ballard, J.D. Variations in TcdB Activity and the Hypervirulence of Emerging Strains of Clostridium Difficile. *PLoS Pathog* **2010**, *6*, e1001061, doi:10.1371/journal.ppat.1001061.
351. Lanis, J.M.; Heinlen, L.D.; James, J.A.; Ballard, J.D. Clostridium Difficile 027/BI/NAP1 Encodes a Hypertoxic and Antigenically Variable Form of TcdB. *PLoS Pathog* **2013**, *9*, e1003523, doi:10.1371/journal.ppat.1003523.
352. Lyerly, D.M.; Saum, K.E.; MacDonald, D.K.; Wilkins, T.D. Effects of Clostridium Difficile Toxins given Intragastrically to Animals. *Infect Immun* **1985**, *47*, 349–352, doi:10.1128/iai.47.2.349-352.1985.
353. Kyne, L.; Warny, M.; Qamar, A.; Kelly, C.P. Association between Antibody Response to Toxin A and Protection against Recurrent Clostridium Difficile Diarrhoea. *The Lancet* **2001**, *357*, 189–193, doi:10.1016/S0140-6736(00)03592-3.
354. Mitchell, T.J.; Ketley, J.M.; Haslam, S.C.; Stephen, J.; Burdon, D.W.; Candy, D.C.; Daniel, R. Effect of Toxin A and B of Clostridium Difficile on Rabbit Ileum and Colon. *Gut* **1986**, *27*, 78–85, doi:10.1136/gut.27.1.78.
355. Savidge, T.C.; Pan, W.; Newman, P.; O'Brien, M.; Anton, P.M.; Pothoulakis, C. Clostridium Difficile Toxin B Is an Inflammatory Enterotoxin in Human Intestine. *Gastroenterology* **2003**, *125*, 413–420, doi:10.1016/S0016-5085(03)00902-8.
356. Hamm, E.E.; Voth, D.E.; Ballard, J.D. Identification of *Clostridium Difficile* Toxin B Cardiotoxicity Using a Zebrafish Embryo Model of Intoxication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 14176–14181, doi:10.1073/pnas.0604725103.
357. Lyras, D.; O'Connor, J.R.; Howarth, P.M.; Sambol, S.P.; Carter, G.P.; Phumoonna, T.; Poon, R.; Adams, V.; Vedantam, G.; Johnson, S.; et al. Toxin B Is Essential for Virulence of Clostridium Difficile. *Nature* **2009**, *458*, 1176–1179, doi:10.1038/nature07822.
358. Monot, M.; Eckert, C.; Lemire, A.; Hamiot, A.; Dubois, T.; Tessier, C.; Dumoulaud, B.; Hamel, B.; Petit, A.; Lalande, V.; et al. Clostridium Difficile: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Sci Rep* **2015**, *5*, 15023, doi:10.1038/srep15023.
359. Stubbs, S.; Rupnik, M.; Gibert, M.; Brazier, J.; Duerden, B.; Popoff, M. Production of Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase (Binary Toxin) by Strains of Clostridium Difficile. *FEMS Microbiology Letters* **2000**, *186*, 307–312, doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09122.x.
360. Bacci, S.; Mølbak, K.; Kjeldsen, M.K.; Olsen, K.E.P. Binary Toxin and Death after *Clostridium Difficile* Infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 976–982, doi:10.3201/eid1706.101483.
361. Perelle, S.; Gibert, M.; Bourlioux, P.; Corthier, G.; Popoff, M.R. Production of a Complete Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) by Clostridium Difficile CD196. *Infect Immun* **1997**, *65*, 1402–1407, doi:10.1128/iai.65.4.1402-1407.1997.
362. Carter, G.P.; Lyras, D.; Allen, D.L.; Mackin, K.E.; Howarth, P.M.; O'Connor, J.R.; Rood, J.I. Binary Toxin Production in *Clostridium Difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator. *J Bacteriol* **2007**, *189*, 7290–7301, doi:10.1128/JB.00731-07.

363. Gerding, D.N.; Johnson, S.; Rupnik, M.; Aktories, K. *Clostridium Difficile* Binary Toxin CDT: Mechanism, Epidemiology, and Potential Clinical Importance. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 15–27, doi:10.4161/gmic.26854.
364. Eckert, C.; Emirian, A.; Le Monnier, A.; Cathala, L.; De Montclos, H.; Goret, J.; Berger, P.; Petit, A.; De Chevigny, A.; Jean-Pierre, H.; et al. Prevalence and Pathogenicity of Binary Toxin–Positive *Clostridium Difficile* Strains That Do Not Produce Toxins A and B. *New Microbes and New Infections* **2015**, *3*, 12–17, doi:10.1016/j.nmni.2014.10.003.
365. Perelle, S.; Scalzo, S.; Kochi, S.; Mock, M.; Popoff, M.R. Immunological and Functional Comparison between *Clostridium Perfringens* Iota Toxin, C. Spiroforme Toxin, and Anthrax Toxins. *FEMS Microbiology Letters* **2006**, *146*, 117–121, doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10180.x.
366. Papatheodorou, P.; Carette, J.E.; Bell, G.W.; Schwan, C.; Guttenberg, G.; Brummelkamp, T.R.; Aktories, K. Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR) Is the Host Receptor for the Binary Toxin *Clostridium Difficile* Transferase (CDT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 16422–16427, doi:10.1073/pnas.1109772108.
367. Mesli, S.; Javorschi, S.; Bérard, A.M.; Landry, M.; Priddle, H.; Kivlichan, D.; Smith, A.J.H.; Yen, F.T.; Bihain, B.E.; Darmon, M. Distribution of the Lipolysis Stimulated Receptor in Adult and Embryonic Murine Tissues and Lethality of LSR^{-/-} Embryos at 12.5 to 14.5 Days of Gestation: LSR Gene and Protein Expression. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271*, 3103–3114, doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04223.x.
368. Nagahama, M.; Yamaguchi, A.; Hagiya, T.; Ohkubo, N.; Kobayashi, K.; Sakurai, J. Binding and Internalization of *Clostridium Perfringens* Iota-Toxin in Lipid Rafts. *Infect Immun* **2004**, *72*, 3267–3275, doi:10.1128/IAI.72.6.3267-3275.2004.
369. Blöcker, D.; Behlke, J.; Aktories, K.; Barth, H. Cellular Uptake of the *Clostridium Perfringens* Binary Iota-Toxin. *Infect Immun* **2001**, *69*, 2980–2987, doi:10.1128/IAI.69.5.2980-2987.2001.
370. Aktories, K.; Lang, A.E.; Schwan, C.; Mannherz, H.G. Actin as Target for Modification by Bacterial Protein Toxins: Actin as Target for Toxin Modification. *FEBS Journal* **2011**, *278*, 4526–4543, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08113.x.
371. Schwan, C.; Stecher, B.; Tzivelekidis, T.; van Ham, M.; Rohde, M.; Hardt, W.-D.; Wehland, J.; Aktories, K. *Clostridium Difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLoS Pathog* **2009**, *5*, e1000626, doi:10.1371/journal.ppat.1000626.
372. Schwan, C.; Kruppke, A.S.; Nölke, T.; Schumacher, L.; Koch-Nolte, F.; Kudryashev, M.; Stahlberg, H.; Aktories, K. *Clostridium Difficile* Toxin CDT Hijacks Microtubule Organization and Reroutes Vesicle Traffic to Increase Pathogen Adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 2313–2318, doi:10.1073/pnas.1311589111.
373. Geric, B.; Carman, R.J.; Rupnik, M.; Genheimer, C.W.; Sambol, S.P.; Lyerly, D.M.; Gerding, D.N.; Johnson, S. Binary Toxin–Producing, Large Clostridial Toxin–Negative *Clostridium Difficile* Strains Are Enterotoxic but Do Not Cause Disease in Hamsters. *J INFECT DIS* **2006**, *193*, 1143–1150, doi:10.1086/501368.
374. Barbut, F.; Gariazzo, B.; Bonné, L.; Lalande, V.; Burghoffer, B.; Luiuz, R.; Petit, J.-C. Clinical Features of *Clostridium Difficile* –Associated Infections and Molecular Characterization of Strains: Results of a Retrospective Study, 2000-2004. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2007**, *28*, 131–139, doi:10.1086/511794.
375. Goldenberg, S.D.; French, G.L. Lack of Association of TcdC Type and Binary Toxin Status with Disease Severity and Outcome in Toxigenic *Clostridium Difficile*. *Journal of Infection* **2011**, *62*, 355–362, doi:10.1016/j.jinf.2011.03.001.
376. Péchiné, S.; Collignon, A. Immune Responses Induced by *Clostridium Difficile*. *Anaerobe* **2016**, *41*, 68–78, doi:10.1016/j.anaerobe.2016.04.014.
377. El Feghaly, R.E.; Stauber, J.L.; Deych, E.; Gonzalez, C.; Tarr, P.I.; Haslam, D.B. Markers of Intestinal Inflammation, Not Bacterial Burden, Correlate With Clinical Outcomes in *Clostridium Difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases* **2013**, *56*, 1713–1721, doi:10.1093/cid/cit147.
378. Buonomo, E.L.; Petri, W.A. The Microbiota and Immune Response during *Clostridium Difficile* Infection. *Anaerobe* **2016**, *41*, 79–84, doi:10.1016/j.anaerobe.2016.05.009.

379. Czepiel, J.; Biesiada, G.; Drózdź, M.; Gdula-Argasińska, J.; Żurańska, J.; Marchewka, J.; Perucki, W.; Wołkow, P.; Garlicki, A. The Presence of IL-8 +781 T/C Polymorphism Is Associated with the Parameters of Severe *Clostridium Difficile* Infection. *Microbial Pathogenesis* **2018**, *114*, 281–285, doi:10.1016/j.micpath.2017.11.066.
380. Netea, M.G.; Nold-Petry, C.A.; Nold, M.F.; Joosten, L.A.B.; Opitz, B.; van der Meer, J.H.M.; van de Veerdonk, F.L.; Ferwerda, G.; Heinhuis, B.; Devesa, I.; et al. Differential Requirement for the Activation of the Inflammasome for Processing and Release of IL-1 β in Monocytes and Macrophages. *Blood* **2009**, *113*, 2324–2335, doi:10.1182/blood-2008-03-146720.
381. Cowardin, C.A.; Kuehne, S.A.; Buonomo, E.L.; Marie, C.S.; Minton, N.P.; Petri, W.A. Inflammasome Activation Contributes to Interleukin-23 Production in Response to *Clostridium Difficile*. *mBio* **2015**, *6*, e02386-14, doi:10.1128/mBio.02386-14.
382. Cowardin, C.A.; Buonomo, E.L.; Saleh, M.M.; Wilson, M.G.; Burgess, S.L.; Kuehne, S.A.; Schwan, C.; Eichhoff, A.M.; Koch-Nolte, F.; Lyras, D.; et al. The Binary Toxin CDT Enhances *Clostridium Difficile* Virulence by Suppressing Protective Colonic Eosinophilia. *Nat Microbiol* **2016**, *1*, 16108, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.108.
383. Buonomo, E.L.; Cowardin, C.A.; Wilson, M.G.; Saleh, M.M.; Pramoongjago, P.; Petri, W.A. Microbiota-Regulated IL-25 Increases Eosinophil Number to Provide Protection during *Clostridium Difficile* Infection. *Cell Reports* **2016**, *16*, 432–443, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.007.
384. Kulaylat, A.S.; Buonomo, E.L.; Scully, K.W.; Hollenbeak, C.S.; Cook, H.; Petri, W.A.; Stewart, D.B. Development and Validation of a Prediction Model for Mortality and Adverse Outcomes Among Patients With Peripheral Eosinopenia on Admission for *Clostridium Difficile* Infection. *JAMA Surg* **2018**, *153*, 1127, doi:10.1001/jamasurg.2018.3174.
385. Spencer, L.A.; Weller, P.F. Eosinophils and Th2 Immunity: Contemporary Insights. *Immunol Cell Biol* **2010**, *88*, 250–256, doi:10.1038/icb.2009.115.
386. Voehringer, D.; Shinkai, K.; Locksley, R.M. Type 2 Immunity Reflects Orchestrated Recruitment of Cells Committed to IL-4 Production. *Immunity* **2004**, *20*, 267–277, doi:10.1016/S1074-7613(04)00026-3.
387. Fahy, J.V. Type 2 Inflammation in Asthma — Present in Most, Absent in Many. *Nat Rev Immunol* **2015**, *15*, 57–65, doi:10.1038/nri3786.
388. Jarchum, I.; Liu, M.; Shi, C.; Equinda, M.; Pamer, E.G. Critical Role for MyD88-Mediated Neutrophil Recruitment during *Clostridium Difficile* Colitis. *Infect Immun* **2012**, *80*, 2989–2996, doi:10.1128/IAI.00448-12.
389. Langrish, C.L.; McKenzie, B.S.; Wilson, N.J.; de Waal Malefyt, R.; Kastelein, R.A.; Cua, D.J. IL-12 and IL-23: Master Regulators of Innate and Adaptive Immunity. *Immunol Rev* **2004**, *202*, 96–105, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00214.x.
390. Iwakura, Y. The IL-23/IL-17 Axis in Inflammation. *Journal of Clinical Investigation* **2006**, *116*, 1218–1222, doi:10.1172/JCI28508.
391. Xu, H.; Yang, J.; Gao, W.; Li, L.; Li, P.; Zhang, L.; Gong, Y.-N.; Peng, X.; Xi, J.J.; Chen, S.; et al. Innate Immune Sensing of Bacterial Modifications of Rho GTPases by the Pyrin Inflammasome. *Nature* **2014**, *513*, 237–241, doi:10.1038/nature13449.
392. Bobo, L.D.; El Feghaly, R.E.; Chen, Y.-S.; Dubberke, E.R.; Han, Z.; Baker, A.H.; Li, J.; Burnham, C.-A.D.; Haslam, D.B. MAPK-Activated Protein Kinase 2 Contributes to *Clostridium Difficile*-Associated Inflammation. *Infect Immun* **2013**, *81*, 713–722, doi:10.1128/IAI.00186-12.
393. Jafari, N.V.; Kuehne, S.A.; Bryant, C.E.; Elawad, M.; Wren, B.W.; Minton, N.P.; Allan, E.; Bajaj-Elliott, M. *Clostridium Difficile* Modulates Host Innate Immunity via Toxin-Independent and Dependent Mechanism(s). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69846, doi:10.1371/journal.pone.0069846.
394. Ng, J.; Hirota, S.A.; Gross, O.; Li, Y.; Ulke-Lemee, A.; Potentier, M.S.; Schenck, L.P.; Vilaysane, A.; Seamone, M.E.; Feng, H.; et al. *Clostridium Difficile* Toxin-Induced Inflammation and Intestinal Injury Are Mediated by the Inflammasome. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 542–552.e3, doi:10.1053/j.gastro.2010.04.005.
395. Mahida, Y.R.; Makh, S.; Hyde, S.; Gray, T.; Borriello, S.P. Effect of *Clostridium Difficile* Toxin A on Human Intestinal Epithelial Cells: Induction of Interleukin 8 Production and Apoptosis after Cell Detachment. *Gut* **1996**, *38*, 337–347, doi:10.1136/gut.38.3.337.

396. Hansen, A.; Alston, L.; Tulk, S.E.; Schenck, L.P.; Grassie, M.E.; Alhassan, B.F.; Veermalla, A.T.; Al-Bashir, S.; Gendron, F.-P.; Altier, C.; et al. The P2Y6 Receptor Mediates Clostridium Difficile Toxin-Induced CXCL8/IL-8 Production and Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81491, doi:10.1371/journal.pone.0081491.
397. Vanaja, S.K.; Rathinam, V.A.K.; Fitzgerald, K.A. Mechanisms of Inflammasome Activation: Recent Advances and Novel Insights. *Trends in Cell Biology* **2015**, *25*, 308–315, doi:10.1016/j.tcb.2014.12.009.
398. Batah, J.; Kobeissy, H.; Bui Pham, P.T.; Denève-Larrazet, C.; Kuehne, S.; Collignon, A.; Janoir-Jouveshomme, C.; Marvaud, J.-C.; Kansau, I. Clostridium Difficile Flagella Induce a Pro-Inflammatory Response in Intestinal Epithelium of Mice in Cooperation with Toxins. *Sci Rep* **2017**, *7*, 3256, doi:10.1038/s41598-017-03621-z.
399. Leuzzi, R.; Spencer, J.; Buckley, A.; Brettoni, C.; Martinelli, M.; Tulli, L.; Marchi, S.; Luzzi, E.; Irvine, J.; Candlish, D.; et al. Protective Efficacy Induced by Recombinant Clostridium Difficile Toxin Fragments. *Infect Immun* **2013**, *81*, 2851–2860, doi:10.1128/IAI.01341-12.
400. Kelly, C.P.; Pothoulakis, C.; Orellana, J.; Lamont, J.T. Human Colonic Aspirates Containing Immunoglobulin A Antibody to Clostridium Difficile Toxin A Inhibit Toxin A-Receptor Binding. *Gastroenterology* **1992**, *102*, 35–40, doi:10.1016/0016-5085(92)91781-X.
401. Warny, M.; Vaerman, J.P.; Avesani, V.; Delmée, M. Human Antibody Response to Clostridium Difficile Toxin A in Relation to Clinical Course of Infection. *Infect Immun* **1994**, *62*, 384–389, doi:10.1128/iai.62.2.384-389.1994.
402. Johal, S.S. Colonic IgA Producing Cells and Macrophages Are Reduced in Recurrent and Non-Recurrent Clostridiumdifficile Associated Diarrhoea. *Journal of Clinical Pathology* **2004**, *57*, 973–979, doi:10.1136/jcp.2003.015875.
403. Drudy, D.; Calabi, E.; Kyne, L.; Sougioultzis, S.; Kelly, E.; Fairweather, N.; Kelly, C.P. Human Antibody Response to Surface Layer Proteins in Clostridium Difficile Infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **2004**, *41*, 237–242, doi:10.1016/j.femsim.2004.03.007.
404. Péchiné, S.; Gleizes, A.; Janoir, C.; Gorges-Kergot, R.; Barc, M.-C.; Delmée, M.; Collignon, A. Immunological Properties of Surface Proteins of Clostridium Difficile. *Journal of Medical Microbiology* **2005**, *54*, 193–196, doi:10.1099/jmm.0.45800-0.
405. Kyne, L.; Warny, M.; Qamar, A.; Kelly, C.P. Asymptomatic Carriage of Clostridium Difficile and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. *N Engl J Med* **2000**, *342*, 390–397, doi:10.1056/NEJM200002103420604.
406. Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of ProIL-Beta. *Molecular Cell* **2002**, *10*, 417–426, doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3.
407. Chen, K.W.; Monteleone, M.; Boucher, D.; Sollberger, G.; Ramnath, D.; Condon, N.D.; von Pein, J.B.; Broz, P.; Sweet, M.J.; Schroder, K. Noncanonical Inflammasome Signaling Elicits Gasdermin D-Dependent Neutrophil Extracellular Traps. *Sci. Immunol.* **2018**, *3*, eaar6676, doi:10.1126/sciimmunol.aar6676.
408. Zanoni, I.; Tan, Y.; Di Gioia, M.; Broggi, A.; Ruan, J.; Shi, J.; Donado, C.A.; Shao, F.; Wu, H.; Springstead, J.R.; et al. An Endogenous Caspase-11 Ligand Elicits Interleukin-1 Release from Living Dendritic Cells. *Science* **2016**, *352*, 1232–1236, doi:10.1126/science.aaf3036.
409. Keshavarz Shahbaz, S.; Koushki, K.; Ayati, S.H.; Bland, A.R.; Bezsonov, E.E.; Sahebkar, A. Inflammasomes and Colorectal Cancer. *Cells* **2021**, *10*, 2172, doi:10.3390/cells10092172.
410. Zhu, S.; Ding, S.; Wang, P.; Wei, Z.; Pan, W.; Palm, N.W.; Yang, Y.; Yu, H.; Li, H.-B.; Wang, G.; et al. Nlrp9b Inflammasome Restricts Rotavirus Infection in Intestinal Epithelial Cells. *Nature* **2017**, *546*, 667–670, doi:10.1038/nature22967.
411. Strowig, T.; Henao-Mejia, J.; Elinav, E.; Flavell, R. Inflammasomes in Health and Disease. *Nature* **2012**, *481*, 278–286, doi:10.1038/nature10759.
412. Liston, A.; Masters, S.L. Homeostasis-Altering Molecular Processes as Mechanisms of Inflammasome Activation. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 208–214, doi:10.1038/nri.2016.151.
413. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801, doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.

414. Joosten, L.A.B.; Abdollahi-Roodsaz, S.; Dinarello, C.A.; O'Neill, L.; Netea, M.G. Toll-like Receptors and Chronic Inflammation in Rheumatic Diseases: New Developments. *Nat Rev Rheumatol* **2016**, *12*, 344–357, doi:10.1038/nrrheum.2016.61.
415. Aksoy, E.; Taboubi, S.; Torres, D.; Delbauve, S.; Hachani, A.; Whitehead, M.A.; Pearce, W.P.; Berenjeno, I.M.; Nock, G.; Filloux, A.; et al. The P110 δ Isoform of the Kinase PI(3)K Controls the Subcellular Compartmentalization of TLR4 Signaling and Protects from Endotoxic Shock. *Nat Immunol* **2012**, *13*, 1045–1054, doi:10.1038/ni.2426.
416. Kawai, T.; Akira, S. TLR Signaling. *Cell Death Differ* **2006**, *13*, 816–825, doi:10.1038/sj.cdd.4401850.
417. Arthur, J.S.C.; Ley, S.C. Mitogen-Activated Protein Kinases in Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* **2013**, *13*, 679–692, doi:10.1038/nri3495.
418. Pachathundikandi, S.K.; Lind, J.; Tegtmeyer, N.; El-Omar, E.M.; Backert, S. Interplay of the Gastric Pathogen *Helicobacter Pylori* with Toll-Like Receptors. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 1–12, doi:10.1155/2015/192420.
419. Ye, Z.; Ting, J.P.-Y. NLR, the Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat Containing Gene Family. *Current Opinion in Immunology* **2008**, *20*, 3–9, doi:10.1016/j.coi.2008.01.003.
420. Franchi, L.; McDonald, C.; Kanneganti, T.-D.; Amer, A.; Núñez, G. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors: Intracellular Pattern Recognition Molecules for Pathogen Detection and Host Defense. *J Immunol* **2006**, *177*, 3507–3513, doi:10.4049/jimmunol.177.6.3507.
421. Ting, J.P.-Y.; Lovering, R.C.; Alnemri, E.S.; Bertin, J.; Boss, J.M.; Davis, B.K.; Flavell, R.A.; Girardin, S.E.; Godzik, A.; Harton, J.A.; et al. The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. *Immunity* **2008**, *28*, 285–287, doi:10.1016/j.immuni.2008.02.005.
422. Hibino, T.; Loza-Coll, M.; Messier, C.; Majeske, A.J.; Cohen, A.H.; Terwilliger, D.P.; Buckley, K.M.; Brockton, V.; Nair, S.V.; Berney, K.; et al. The Immune Gene Repertoire Encoded in the Purple Sea Urchin Genome. *Developmental Biology* **2006**, *300*, 349–365, doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.065.
423. Inohara, N.; Núñez, G. NODs: Intracellular Proteins Involved in Inflammation and Apoptosis. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 371–382, doi:10.1038/nri1086.
424. Inohara, N.; Núñez, G. The NOD: A Signaling Module That Regulates Apoptosis and Host Defense against Pathogens. *Oncogene* **2001**, *20*, 6473–6481, doi:10.1038/sj.onc.1204787.
425. McDonald, C.; Inohara, N.; Núñez, G. Peptidoglycan Signaling in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 20177–20180, doi:10.1074/jbc.R500001200.
426. Kim, Y.-G.; Park, J.-H.; Shaw, M.H.; Franchi, L.; Inohara, N.; Núñez, G. The Cytosolic Sensors Nod1 and Nod2 Are Critical for Bacterial Recognition and Host Defense after Exposure to Toll-like Receptor Ligands. *Immunity* **2008**, *28*, 246–257, doi:10.1016/j.immuni.2007.12.012.
427. Masumoto, J.; Yang, K.; Varambally, S.; Hasegawa, M.; Tomlins, S.A.; Qiu, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; Foster, S.J.; Horie, Y.; et al. Nod1 Acts as an Intracellular Receptor to Stimulate Chemokine Production and Neutrophil Recruitment in Vivo. *Journal of Experimental Medicine* **2006**, *203*, 203–213, doi:10.1084/jem.20051229.
428. Shaw, M.H.; Reimer, T.; Kim, Y.-G.; Núñez, G. NOD-like Receptors (NLRs): Bona Fide Intracellular Microbial Sensors. *Current Opinion in Immunology* **2008**, *20*, 377–382, doi:10.1016/j.coi.2008.06.001.
429. Martinon, F.; Tschopp, J. Inflammatory Caspases and Inflammasomes: Master Switches of Inflammation. *Cell Death Differ* **2007**, *14*, 10–22, doi:10.1038/sj.cdd.4402038.
430. Man, S.M.; Kanneganti, T.-D. Converging Roles of Caspases in Inflammasome Activation, Cell Death and Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* **2016**, *16*, 7–21, doi:10.1038/nri.2015.7.
431. Chen, H.; Gan, X.; Li, Y.; Gu, J.; Liu, Y.; Deng, Y.; Wang, X.; Hong, Y.; Hu, Y.; Su, L.; et al. NLRP12- and NLRC4-Mediated Corneal Epithelial Pyroptosis Is Driven by GSDMD Cleavage Accompanied by IL-33 Processing in Dry Eye. *The Ocular Surface* **2020**, *18*, 783–794, doi:10.1016/j.jtos.2020.07.001.
432. Kayagaki, N.; Stowe, I.B.; Lee, B.L.; O'Rourke, K.; Anderson, K.; Warming, S.; Cuellar, T.; Haley, B.; Roose-Girma, M.; Phung, Q.T.; et al. Caspase-11 Cleaves Gasdermin D for Non-Canonical Inflammasome Signalling. *Nature* **2015**, *526*, 666–671, doi:10.1038/nature15541.

433. Shi, J.; Zhao, Y.; Wang, K.; Shi, X.; Wang, Y.; Huang, H.; Zhuang, Y.; Cai, T.; Wang, F.; Shao, F. Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death. *Nature* **2015**, *526*, 660–665, doi:10.1038/nature15514.
434. Tran, L.S.; Tran, D.; De Paoli, A.; D’Costa, K.; Creed, S.J.; Ng, G.Z.; Le, L.; Sutton, P.; Silke, J.; Nachbur, U.; et al. NOD1 Is Required for *Helicobacter Pylori* Induction of IL-33 Responses in Gastric Epithelial Cells. *Cellular Microbiology* **2018**, *20*, e12826, doi:10.1111/cmi.12826.
435. Aglietti, R.A.; Estevez, A.; Gupta, A.; Ramirez, M.G.; Liu, P.S.; Kayagaki, N.; Ciferri, C.; Dixit, V.M.; Dueber, E.C. GsdmD P30 Elicited by Caspase-11 during Pyroptosis Forms Pores in Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, 7858–7863, doi:10.1073/pnas.1607769113.
436. Ding, J.; Wang, K.; Liu, W.; She, Y.; Sun, Q.; Shi, J.; Sun, H.; Wang, D.-C.; Shao, F. Pore-Forming Activity and Structural Autoinhibition of the Gasdermin Family. *Nature* **2016**, *535*, 111–116, doi:10.1038/nature18590.
437. He, W.; Wan, H.; Hu, L.; Chen, P.; Wang, X.; Huang, Z.; Yang, Z.-H.; Zhong, C.-Q.; Han, J. Gasdermin D Is an Executor of Pyroptosis and Required for Interleukin-1 β Secretion. *Cell Res* **2015**, *25*, 1285–1298, doi:10.1038/cr.2015.139.
438. Liu, X.; Zhang, Z.; Ruan, J.; Pan, Y.; Magupalli, V.G.; Wu, H.; Lieberman, J. Inflammasome-Activated Gasdermin D Causes Pyroptosis by Forming Membrane Pores. *Nature* **2016**, *535*, 153–158, doi:10.1038/nature18629.
439. Sborgi, L.; Rühl, S.; Mulvihill, E.; Pipercevic, J.; Heilig, R.; Stahlberg, H.; Farady, C.J.; Müller, D.J.; Broz, P.; Hiller, S. GSDMD Membrane Pore Formation Constitutes the Mechanism of Pyroptotic Cell Death. *EMBO J* **2016**, *35*, 1766–1778, doi:10.15252/embj.201694696.
440. Arend, W.P.; Palmer, G.; Gabay, C. IL-1, IL-18, and IL-33 Families of Cytokines. *Immunological Reviews* **2008**, *223*, 20–38, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00624.x.
441. Xue, Y.; Enosi Tuipulotu, D.; Tan, W.H.; Kay, C.; Man, S.M. Emerging Activators and Regulators of Inflammasomes and Pyroptosis. *Trends in Immunology* **2019**, *40*, 1035–1052, doi:10.1016/j.it.2019.09.005.
442. Swanson, K.V.; Deng, M.; Ting, J.P.-Y. The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics. *Nat Rev Immunol* **2019**, *19*, 477–489, doi:10.1038/s41577-019-0165-0.
443. Man, S.M.; Kanneganti, T.-D. Regulation of Inflammasome Activation. *Immunol Rev* **2015**, *265*, 6–21, doi:10.1111/imr.12296.
444. Pétrilli, V.; Dostert, C.; Muruve, D.A.; Tschopp, J. The Inflammasome: A Danger Sensing Complex Triggering Innate Immunity. *Current Opinion in Immunology* **2007**, *19*, 615–622, doi:10.1016/j.coi.2007.09.002.
445. Duewell, P.; Kono, H.; Rayner, K.J.; Sirois, C.M.; Vladimer, G.; Bauernfeind, F.G.; Abela, G.S.; Franchi, L.; Nuñez, G.; Schnurr, M.; et al. NLRP3 Inflammasomes Are Required for Atherogenesis and Activated by Cholesterol Crystals. *Nature* **2010**, *464*, 1357–1361, doi:10.1038/nature08938.
446. Cassel, S.L.; Eisenbarth, S.C.; Iyer, S.S.; Sadler, J.J.; Colegio, O.R.; Tephly, L.A.; Carter, A.B.; Rothman, P.B.; Flavell, R.A.; Sutterwala, F.S. The Nalp3 Inflammasome Is Essential for the Development of Silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 9035–9040, doi:10.1073/pnas.0803933105.
447. Hornung, V.; Bauernfeind, F.; Halle, A.; Samstad, E.O.; Kono, H.; Rock, K.L.; Fitzgerald, K.A.; Latz, E. Silica Crystals and Aluminum Salts Activate the NALP3 Inflammasome through Phagosomal Destabilization. *Nat Immunol* **2008**, *9*, 847–856, doi:10.1038/ni.1631.
448. Bauernfeind, F.G.; Horvath, G.; Stutz, A.; Alnemri, E.S.; MacDonald, K.; Speert, D.; Fernandes-Alnemri, T.; Wu, J.; Monks, B.G.; Fitzgerald, K.A.; et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol* **2009**, *183*, 787–791, doi:10.4049/jimmunol.0901363.
449. Lin, K.-M.; Hu, W.; Troutman, T.D.; Jennings, M.; Brewer, T.; Li, X.; Nanda, S.; Cohen, P.; Thomas, J.A.; Pasare, C. IRAK-1 Bypasses Priming and Directly Links TLRs to Rapid NLRP3 Inflammasome Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 775–780, doi:10.1073/pnas.1320294111.

450. Fernandes-Alnemri, T.; Kang, S.; Anderson, C.; Sagara, J.; Fitzgerald, K.A.; Alnemri, E.S. Cutting Edge: TLR Signaling Licenses IRAK1 for Rapid Activation of the NLRP3 Inflammasome. *J.I.* **2013**, *191*, 3995–3999, doi:10.4049/jimmunol.1301681.
451. Place, D.E.; Samir, P.; Karki, R.; Briard, B.; Vogel, P.; Kanneganti, T.-D. ASK Family Kinases Are Required for Optimal NLRP3 Inflammasome Priming. *The American Journal of Pathology* **2018**, *188*, 1021–1030, doi:10.1016/j.ajpath.2017.12.006.
452. Gurung, P.; Anand, P.K.; Malireddi, R.K.S.; Vande Walle, L.; Van Opdenbosch, N.; Dillon, C.P.; Weinlich, R.; Green, D.R.; Lamkanfi, M.; Kanneganti, T.-D. FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. *J.I.* **2014**, *192*, 1835–1846, doi:10.4049/jimmunol.1302839.
453. Gurung, P.; Lamkanfi, M.; Kanneganti, T.-D. Cutting Edge: SHARPIN Is Required for Optimal NLRP3 Inflammasome Activation. *J.I.* **2015**, *194*, 2064–2067, doi:10.4049/jimmunol.1402951.
454. Lin, T.-Y.; Wei, T.-Y.W.; Li, S.; Wang, S.-C.; He, M.; Martin, M.; Zhang, J.; Shentu, T.-P.; Xiao, H.; Kang, J.; et al. TIFA as a Crucial Mediator for NLRP3 Inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, 15078–15083, doi:10.1073/pnas.1618773114.
455. Song, H.; Liu, B.; Huai, W.; Yu, Z.; Wang, W.; Zhao, J.; Han, L.; Jiang, G.; Zhang, L.; Gao, C.; et al. The E3 Ubiquitin Ligase TRIM31 Attenuates NLRP3 Inflammasome Activation by Promoting Proteasomal Degradation of NLRP3. *Nat Commun* **2016**, *7*, 13727, doi:10.1038/ncomms13727.
456. Yan, Y.; Jiang, W.; Liu, L.; Wang, X.; Ding, C.; Tian, Z.; Zhou, R. Dopamine Controls Systemic Inflammation through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Cell* **2015**, *160*, 62–73, doi:10.1016/j.cell.2014.11.047.
457. Humphries, F.; Bergin, R.; Jackson, R.; Delagic, N.; Wang, B.; Yang, S.; Dubois, A.V.; Ingram, R.J.; Moynagh, P.N. The E3 Ubiquitin Ligase Pellino2 Mediates Priming of the NLRP3 Inflammasome. *Nat Commun* **2018**, *9*, 1560, doi:10.1038/s41467-018-03669-z.
458. Guo, C.; Xie, S.; Chi, Z.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhang, L.; Zheng, M.; Zhang, X.; Xia, D.; Ke, Y.; et al. Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Immunity* **2016**, *45*, 802–816, doi:10.1016/j.immuni.2016.09.008.
459. Mortimer, L.; Moreau, F.; MacDonald, J.A.; Chadee, K. NLRP3 Inflammasome Inhibition Is Disrupted in a Group of Auto-Inflammatory Disease CAPS Mutations. *Nat Immunol* **2016**, *17*, 1176–1186, doi:10.1038/ni.3538.
460. Zhang, Z.; Meszaros, G.; He, W.; Xu, Y.; de Fatima Magliarelli, H.; Mailly, L.; Mihlan, M.; Liu, Y.; Puig Gámez, M.; Goginashvili, A.; et al. Protein Kinase D at the Golgi Controls NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Experimental Medicine* **2017**, *214*, 2671–2693, doi:10.1084/jem.20162040.
461. Barry, R.; John, S.W.; Liccardi, G.; Tenev, T.; Jaco, I.; Chen, C.-H.; Choi, J.; Kasperkiewicz, P.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.; et al. SUMO-Mediated Regulation of NLRP3 Modulates Inflammasome Activity. *Nat Commun* **2018**, *9*, 3001, doi:10.1038/s41467-018-05321-2.
462. Franchi, L.; Kanneganti, T.-D.; Dubyak, G.R.; Núñez, G. Differential Requirement of P2X7 Receptor and Intracellular K⁺ for Caspase-1 Activation Induced by Intracellular and Extracellular Bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 18810–18818, doi:10.1074/jbc.M610762200.
463. Arlehamn, C.S.L.; Pétrilli, V.; Gross, O.; Tschopp, J.; Evans, T.J. The Role of Potassium in Inflammasome Activation by Bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 10508–10518, doi:10.1074/jbc.M109.067298.
464. Lee, G.-S.; Subramanian, N.; Kim, A.I.; Aksentijevich, I.; Goldbach-Mansky, R.; Sacks, D.B.; Germain, R.N.; Kastner, D.L.; Chae, J.J. The Calcium-Sensing Receptor Regulates the NLRP3 Inflammasome through Ca²⁺ and CAMP. *Nature* **2012**, *492*, 123–127, doi:10.1038/nature11588.
465. Rimessi, A.; Bezzerri, V.; Patergnani, S.; Marchi, S.; Cabrini, G.; Pinton, P. Mitochondrial Ca²⁺-Dependent NLRP3 Activation Exacerbates the Pseudomonas Aeruginosa-Driven Inflammatory Response in Cystic Fibrosis. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6201, doi:10.1038/ncomms7201.
466. Katsnelson, M.A.; Rucker, L.G.; Russo, H.M.; Dubyak, G.R. K⁺ Efflux Agonists Induce NLRP3 Inflammasome Activation Independently of Ca²⁺ Signaling. *J.I.* **2015**, *194*, 3937–3952, doi:10.4049/jimmunol.1402658.

467. Costa, A.; Gupta, R.; Signorino, G.; Malara, A.; Cardile, F.; Biondo, C.; Midiri, A.; Galbo, R.; Trieu-Cuot, P.; Papasergi, S.; et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome by Group B Streptococci. *J.I.* **2012**, *188*, 1953–1960, doi:10.4049/jimmunol.1102543.
468. Mayor, A.; Martinon, F.; De Smedt, T.; Pétrilli, V.; Tschopp, J. A Crucial Function of SGT1 and HSP90 in Inflammasome Activity Links Mammalian and Plant Innate Immune Responses. *Nat Immunol* **2007**, *8*, 497–503, doi:10.1038/ni1459.
469. Zhou, R.; Yazdi, A.S.; Menu, P.; Tschopp, J. A Role for Mitochondria in NLRP3 Inflammasome Activation. *Nature* **2011**, *469*, 221–225, doi:10.1038/nature09663.
470. Shimada, K.; Crother, T.R.; Karlin, J.; Dagvadorj, J.; Chiba, N.; Chen, S.; Ramanujan, V.K.; Wolf, A.J.; Vergnes, L.; Ojcius, D.M.; et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* **2012**, *36*, 401–414, doi:10.1016/j.immuni.2012.01.009.
471. Shenoy, A.R.; Wellington, D.A.; Kumar, P.; Kassa, H.; Booth, C.J.; Cresswell, P.; MacMicking, J.D. GBP5 Promotes NLRP3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals. *Science* **2012**, *336*, 481–485, doi:10.1126/science.1217141.
472. Lu, B.; Nakamura, T.; Inouye, K.; Li, J.; Tang, Y.; Lundbäck, P.; Valdes-Ferrer, S.I.; Olofsson, P.S.; Kalb, T.; Roth, J.; et al. Novel Role of PKR in Inflammasome Activation and HMGB1 Release. *Nature* **2012**, *488*, 670–674, doi:10.1038/nature11290.
473. Vyleta, M.L.; Wong, J.; Magun, B.E. Suppression of Ribosomal Function Triggers Innate Immune Signaling through Activation of the NLRP3 Inflammasome. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36044, doi:10.1371/journal.pone.0036044.
474. Sharif, H.; Wang, L.; Wang, W.L.; Magupalli, V.G.; Andreeva, L.; Qiao, Q.; Hauenstein, A.V.; Wu, Z.; Núñez, G.; Mao, Y.; et al. Structural Mechanism for NEK7-Licensed Activation of NLRP3 Inflammasome. *Nature* **2019**, *570*, 338–343, doi:10.1038/s41586-019-1295-z.
475. Kayagaki, N.; Warming, S.; Lamkanfi, M.; Walle, L.V.; Louie, S.; Dong, J.; Newton, K.; Qu, Y.; Liu, J.; Heldens, S.; et al. Non-Canonical Inflammasome Activation Targets Caspase-11. *Nature* **2011**, *479*, 117–121, doi:10.1038/nature10558.
476. Shi, J.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Gao, W.; Ding, J.; Li, P.; Hu, L.; Shao, F. Inflammatory Caspases Are Innate Immune Receptors for Intracellular LPS. *Nature* **2014**, *514*, 187–192, doi:10.1038/nature13683.
477. Rühl, S.; Broz, P. Caspase-11 Activates a Canonical NLRP3 Inflammasome by Promoting K⁺ Efflux. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 2927–2936, doi:10.1002/eji.201545772.
478. Baker, P.J.; Boucher, D.; Bierschenk, D.; Tebartz, C.; Whitney, P.G.; D’Silva, D.B.; Tanzer, M.C.; Monteleone, M.; Robertson, A.A.B.; Cooper, M.A.; et al. NLRP3 Inflammasome Activation Downstream of Cytoplasmic LPS Recognition by Both Caspase-4 and Caspase-5: Innate Immunity. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 2918–2926, doi:10.1002/eji.201545655.
479. Yang, D.; He, Y.; Muñoz-Planillo, R.; Liu, Q.; Núñez, G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity* **2015**, *43*, 923–932, doi:10.1016/j.immuni.2015.10.009.
480. Man, S.M.; Karki, R.; Malireddi, R.K.S.; Neale, G.; Vogel, P.; Yamamoto, M.; Lamkanfi, M.; Kanneganti, T.-D. The Transcription Factor IRF1 and Guanylate-Binding Proteins Target Activation of the AIM2 Inflammasome by Francisella Infection. *Nat Immunol* **2015**, *16*, 467–475, doi:10.1038/ni.3118.
481. Man, S.M.; Karki, R.; Sasai, M.; Place, D.E.; Kesavardhana, S.; Temirov, J.; Frase, S.; Zhu, Q.; Malireddi, R.K.S.; Kuriakose, T.; et al. IRGB1 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes. *Cell* **2016**, *167*, 382–396.e17, doi:10.1016/j.cell.2016.09.012.
482. Meunier, E.; Wallet, P.; Dreier, R.F.; Costanzo, S.; Anton, L.; Rühl, S.; Dussurgey, S.; Dick, M.S.; Kistner, A.; Rigard, M.; et al. Guanylate-Binding Proteins Promote Activation of the AIM2 Inflammasome during Infection with Francisella Novicida. *Nat Immunol* **2015**, *16*, 476–484, doi:10.1038/ni.3119.
483. Vanaja, S.K.; Russo, A.J.; Behl, B.; Banerjee, I.; Yankova, M.; Deshmukh, S.D.; Rathinam, V.A.K. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* **2016**, *165*, 1106–1119, doi:10.1016/j.cell.2016.04.015.

484. Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The Inflammasome. *Molecular Cell* **2002**, *10*, 417–426, doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3.
485. Bruey, J.-M.; Bruey-Sedano, N.; Luciano, F.; Zhai, D.; Balpai, R.; Xu, C.; Kress, C.L.; Bailly-Maitre, B.; Li, X.; Osterman, A.; et al. Bcl-2 and Bcl-XL Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with NALP1. *Cell* **2007**, *129*, 45–56, doi:10.1016/j.cell.2007.01.045.
486. Boyden, E.D.; Dietrich, W.F. Nalp1b Controls Mouse Macrophage Susceptibility to Anthrax Lethal Toxin. *Nat Genet* **2006**, *38*, 240–244, doi:10.1038/ng1724.
487. Leppla, S.H.; Arora, N.; Varughese, M. Anthrax Toxin Fusion Proteins for Intracellular Delivery of Macromolecules. *J Appl Microbiol* **1999**, *87*, 284–284, doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00890.x.
488. Faustin, B.; Lartigue, L.; Bruey, J.-M.; Luciano, F.; Sergienko, E.; Bailly-Maitre, B.; Volkmann, N.; Hanein, D.; Rouiller, I.; Reed, J.C. Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation. *Molecular Cell* **2007**, *25*, 713–724, doi:10.1016/j.molcel.2007.01.032.
489. Elinav, E.; Strowig, T.; Kau, A.L.; Henao-Mejia, J.; Thaiss, C.A.; Booth, C.J.; Peaper, D.R.; Bertin, J.; Eisenbarth, S.C.; Gordon, J.I.; et al. NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. *Cell* **2011**, *145*, 745–757, doi:10.1016/j.cell.2011.04.022.
490. Chen, G.Y.; Liu, M.; Wang, F.; Bertin, J.; Núñez, G. A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. *J.I.* **2011**, *186*, 7187–7194, doi:10.4049/jimmunol.1100412.
491. Anand, P.K.; Malireddi, R.K.S.; Lukens, J.R.; Vogel, P.; Bertin, J.; Lamkanfi, M.; Kanneganti, T.-D. NLRP6 Negatively Regulates Innate Immunity and Host Defence against Bacterial Pathogens. *Nature* **2012**, *488*, 389–393, doi:10.1038/nature11250.
492. Henao-Mejia, J.; Elinav, E.; Jin, C.; Hao, L.; Mehal, W.Z.; Strowig, T.; Thaiss, C.A.; Kau, A.L.; Eisenbarth, S.C.; Jurczak, M.J.; et al. Inflammasome-Mediated Dysbiosis Regulates Progression of NAFLD and Obesity. *Nature* **2012**, *482*, 179–185, doi:10.1038/nature10809.
493. Khare, S.; Dorfleutner, A.; Bryan, N.B.; Yun, C.; Radian, A.D.; de Almeida, L.; Rojanasakul, Y.; Stehlik, C. An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity* **2012**, *36*, 464–476, doi:10.1016/j.immuni.2012.02.001.
494. Pinheiro, A.S.; Proell, M.; Eibl, C.; Page, R.; Schwarzenbacher, R.; Peti, W. Three-Dimensional Structure of the NLRP7 Pyrin Domain. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 27402–27410, doi:10.1074/jbc.M110.113191.
495. Carriere, J.; Dorfleutner, A.; Stehlik, C. NLRP7: From Inflammasome Regulation to Human Disease. *Immunology* **2021**, *163*, 363–376, doi:10.1111/imm.13372.
496. Fallahian, M.; Sebire, N.J.; Savage, P.M.; Seckl, M.J.; Fisher, R.A. Mutations in *NLRP 7* and *KHDC 3 L* Confer a Complete Hydatidiform Mole Phenotype on Digynic Triploid Conceptions. *Human Mutation* **2013**, *34*, 301–308, doi:10.1002/humu.22228.
497. Deveault, C.; Qian, J.H.; Chebaro, W.; Ao, A.; Gilbert, L.; Mehio, A.; Khan, R.; Tan, S.L.; Wischmeijer, A.; Coullin, P.; et al. NLRP7 Mutations in Women with Diploid Androgenetic and Triploid Moles: A Proposed Mechanism for Mole Formation. *Human Molecular Genetics* **2009**, *18*, 888–897, doi:10.1093/hmg/ddn418.
498. Bürckstümmer, T.; Baumann, C.; Blüml, S.; Dixit, E.; Dürnberger, G.; Jahn, H.; Planyavsky, M.; Bilban, M.; Colinge, J.; Bennett, K.L.; et al. An Orthogonal Proteomic-Genomic Screen Identifies AIM2 as a Cytoplasmic DNA Sensor for the Inflammasome. *Nat Immunol* **2009**, *10*, 266–272, doi:10.1038/ni.1702.
499. Fernandes-Alnemri, T.; Yu, J.-W.; Datta, P.; Wu, J.; Alnemri, E.S. AIM2 Activates the Inflammasome and Cell Death in Response to Cytoplasmic DNA. *Nature* **2009**, *458*, 509–513, doi:10.1038/nature07710.
500. Hornung, V.; Ablasser, A.; Charrel-Dennis, M.; Bauernfeind, F.; Horvath, G.; Caffrey, Daniel.R.; Latz, E.; Fitzgerald, K.A. AIM2 Recognizes Cytosolic DsDNA and Forms a Caspase-1-Activating Inflammasome with ASC. *Nature* **2009**, *458*, 514–518, doi:10.1038/nature07725.
501. Roberts, T.L.; Idris, A.; Dunn, J.A.; Kelly, G.M.; Burnton, C.M.; Hodgson, S.; Hardy, L.L.; Garceau, V.; Sweet, M.J.; Ross, I.L.; et al. HIN-200 Proteins Regulate Caspase Activation in Response to Foreign Cytoplasmic DNA. *Science* **2009**, *323*, 1057–1060, doi:10.1126/science.1169841.

502. Rathinam, V.A.K.; Jiang, Z.; Waggoner, S.N.; Sharma, S.; Cole, L.E.; Waggoner, L.; Vanaja, S.K.; Monks, B.G.; Ganesan, S.; Latz, E.; et al. The AIM2 Inflammasome Is Essential for Host Defense against Cytosolic Bacteria and DNA Viruses. *Nat Immunol* **2010**, *11*, 395–402, doi:10.1038/ni.1864.
503. Jin, T.; Perry, A.; Jiang, J.; Smith, P.; Curry, J.A.; Unterholzner, L.; Jiang, Z.; Horvath, G.; Rathinam, V.A.; Johnstone, R.W.; et al. Structures of the HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor. *Immunity* **2012**, *36*, 561–571, doi:10.1016/j.immuni.2012.02.014.
504. Pierini, R.; Juruj, C.; Perret, M.; Jones, C.L.; Mangeot, P.; Weiss, D.S.; Henry, T. AIM2/ASC Triggers Caspase-8-Dependent Apoptosis in Francisella-Infected Caspase-1-Deficient Macrophages. *Cell Death Differ* **2012**, *19*, 1709–1721, doi:10.1038/cdd.2012.51.
505. Matyszewski, M.; Morrone, S.R.; Sohn, J. Digital Signaling Network Drives the Assembly of the AIM2-ASC Inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115*, doi:10.1073/pnas.1712860115.
506. Fernandes-Alnemri, T.; Yu, J.-W.; Juliana, C.; Solorzano, L.; Kang, S.; Wu, J.; Datta, P.; McCormick, M.; Huang, L.; McDermott, E.; et al. The AIM2 Inflammasome Is Critical for Innate Immunity to Francisella Tularensis. *Nat Immunol* **2010**, *11*, 385–393, doi:10.1038/ni.1859.
507. Chae, J.J.; Cho, Y.-H.; Lee, G.-S.; Cheng, J.; Liu, P.P.; Feigenbaum, L.; Katz, S.I.; Kastner, D.L. Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 β Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity* **2011**, *34*, 755–768, doi:10.1016/j.immuni.2011.02.020.
508. Kanneganti, A.; Malireddi, R.K.S.; Saavedra, P.H.V.; Vande Walle, L.; Van Gorp, H.; Kambara, H.; Tillman, H.; Vogel, P.; Luo, H.R.; Xavier, R.J.; et al. GSDMD Is Critical for Autoinflammatory Pathology in a Mouse Model of Familial Mediterranean Fever. *Journal of Experimental Medicine* **2018**, *215*, 1519–1529, doi:10.1084/jem.20172060.
509. Heilig, R.; Broz, P. Function and Mechanism of the Pyrin Inflammasome. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 230–238, doi:10.1002/eji.201746947.
510. Park, Y.H.; Wood, G.; Kastner, D.L.; Chae, J.J. Pyrin Inflammasome Activation and RhoA Signaling in the Autoinflammatory Diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol* **2016**, *17*, 914–921, doi:10.1038/ni.3457.
511. Chung, L.K.; Park, Y.H.; Zheng, Y.; Brodsky, I.E.; Hearing, P.; Kastner, D.L.; Chae, J.J.; Bliska, J.B. The Yersinia Virulence Factor YopM Hijacks Host Kinases to Inhibit Type III Effector-Triggered Activation of the Pyrin Inflammasome. *Cell Host & Microbe* **2016**, *20*, 296–306, doi:10.1016/j.chom.2016.07.018.
512. Ratner, D.; Orning, M.P.A.; Proulx, M.K.; Wang, D.; Gavrillin, M.A.; Wewers, M.D.; Alnemri, E.S.; Johnson, P.F.; Lee, B.; Meccas, J.; et al. The Yersinia Pestis Effector YopM Inhibits Pyrin Inflammasome Activation. *PLoS Pathog* **2016**, *12*, e1006035, doi:10.1371/journal.ppat.1006035.
513. Gao, W.; Yang, J.; Liu, W.; Wang, Y.; Shao, F. Site-Specific Phosphorylation and Microtubule Dynamics Control Pyrin Inflammasome Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, doi:10.1073/pnas.1601700113.
514. Masters, S.L.; Lagou, V.; J ru, I.; Baker, P.J.; Van Eyck, L.; Parry, D.A.; Lawless, D.; De Nardo, D.; Garcia-Perez, J.E.; Dagley, L.F.; et al. Familial Autoinflammation with Neutrophilic Dermatitis Reveals a Regulatory Mechanism of Pyrin Activation. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, doi:10.1126/scitranslmed.aaf1471.
515. Mansfield, E.; Chae, J.J.; Komarow, H.D.; Brotz, T.M.; Frucht, D.M.; Aksentijevich, I.; Kastner, D.L. The Familial Mediterranean Fever Protein, Pyrin, Associates with Microtubules and Colocalizes with Actin Filaments. *Blood* **2001**, *98*, 851–859, doi:10.1182/blood.V98.3.851.
516. Van Gorp, H.; Saavedra, P.H.V.; de Vasconcelos, N.M.; Van Opdenbosch, N.; Vande Walle, L.; Matusiak, M.; Prencipe, G.; Insalaco, A.; Van Hauwermeiren, F.; Demon, D.; et al. Familial Mediterranean Fever Mutations Lift the Obligatory Requirement for Microtubules in Pyrin Inflammasome Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, 14384–14389, doi:10.1073/pnas.1613156113.
517. Tenthorey, J.L.; Kofoed, E.M.; Daugherty, M.D.; Malik, H.S.; Vance, R.E. Molecular Basis for Specific Recognition of Bacterial Ligands by NAIP/NLRC4 Inflammasomes. *Molecular Cell* **2014**, *54*, 17–29, doi:10.1016/j.molcel.2014.02.018.

518. Hu, Z.; Zhou, Q.; Zhang, C.; Fan, S.; Cheng, W.; Zhao, Y.; Shao, F.; Wang, H.-W.; Sui, S.-F.; Chai, J. Structural and Biochemical Basis for Induced Self-Propagation of NLRC4. *Science* **2015**, *350*, 399–404, doi:10.1126/science.aac5489.
519. Zhang, L.; Chen, S.; Ruan, J.; Wu, J.; Tong, A.B.; Yin, Q.; Li, Y.; David, L.; Lu, A.; Wang, W.L.; et al. Cryo-EM Structure of the Activated NAIP2-NLRC4 Inflammasome Reveals Nucleated Polymerization. *Science* **2015**, *350*, 404–409, doi:10.1126/science.aac5789.
520. Roy, N. The C-IAP-1 and c-IAP-2 Proteins Are Direct Inhibitors of Specific Caspases. *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 6914–6925, doi:10.1093/emboj/16.23.6914.
521. Maier, J.K.X.; Lahoua, Z.; Gendron, N.H.; Fetni, R.; Johnston, A.; Davoodi, J.; Rasper, D.; Roy, S.; Slack, R.S.; Nicholson, D.W.; et al. The Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Is a Direct Inhibitor of Caspases 3 and 7. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 2035–2043, doi:10.1523/JNEUROSCI.22-06-02035.2002.
522. Davoodi, J.; Ghahremani, M.-H.; Es-haghi, A.; Mohammad-gholi, A.; MacKenzie, A. Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein, NAIP, Is an Inhibitor of Procaspace-9. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2010**, *42*, 958–964, doi:10.1016/j.biocel.2010.02.008.
523. Allam, R.; Maillard, M.H.; Tardivel, A.; Chennupati, V.; Bega, H.; Yu, C.W.; Velin, D.; Schneider, P.; Maslowski, K.M. Epithelial NAIPs Protect against Colonic Tumorigenesis. *Journal of Experimental Medicine* **2015**, *212*, 369–383, doi:10.1084/jem.20140474.
524. Sellin, M.E.; Müller, A.A.; Felmy, B.; Dolowschiak, T.; Diard, M.; Tardivel, A.; Maslowski, K.M.; Hardt, W.-D. Epithelium-Intrinsic NAIP/NLRC4 Inflammasome Drives Infected Enterocyte Expulsion to Restrict Salmonella Replication in the Intestinal Mucosa. *Cell Host & Microbe* **2014**, *16*, 237–248, doi:10.1016/j.chom.2014.07.001.
525. Endrizzi, M.G.; Hadinoto, V.; Growney, J.D.; Miller, W.; Dietrich, W.F. Genomic Sequence Analysis of the Mouse *Naip* Gene Array. *Genome Res.* **2000**, *10*, 1095–1102, doi:10.1101/gr.10.8.1095.
526. Kofoed, E.M.; Vance, R.E. Innate Immune Recognition of Bacterial Ligands by NAIPs Determines Inflammasome Specificity. *Nature* **2011**, *477*, 592–595, doi:10.1038/nature10394.
527. Zhao, Y.; Yang, J.; Shi, J.; Gong, Y.-N.; Lu, Q.; Xu, H.; Liu, L.; Shao, F. The NLRC4 Inflammasome Receptors for Bacterial Flagellin and Type III Secretion Apparatus. *Nature* **2011**, *477*, 596–600, doi:10.1038/nature10510.
528. Lightfield, K.L.; Persson, J.; Brubaker, S.W.; Witte, C.E.; von Moltke, J.; Dunipace, E.A.; Henry, T.; Sun, Y.-H.; Cado, D.; Dietrich, W.F.; et al. Critical Function for Naip5 in Inflammasome Activation by a Conserved Carboxy-Terminal Domain of Flagellin. *Nat Immunol* **2008**, *9*, 1171–1178, doi:10.1038/ni.1646.
529. Karki, R.; Lee, E.; Place, D.; Samir, P.; Mavuluri, J.; Sharma, B.R.; Balakrishnan, A.; Malireddi, R.K.S.; Geiger, R.; Zhu, Q.; et al. IRF8 Regulates Transcription of Naips for NLRC4 Inflammasome Activation. *Cell* **2018**, *173*, 920-933.e13, doi:10.1016/j.cell.2018.02.055.
530. Reyes Ruiz, V.M.; Ramirez, J.; Naseer, N.; Palacio, N.M.; Siddarthan, I.J.; Yan, B.M.; Boyer, M.A.; Pensinger, D.A.; Sauer, J.-D.; Shin, S. Broad Detection of Bacterial Type III Secretion System and Flagellin Proteins by the Human NAIP/NLRC4 Inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114*, 13242–13247, doi:10.1073/pnas.1710433114.
531. Poyet, J.-L.; Srinivasula, S.M.; Tnani, M.; Razmara, M.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.S. Identification of Ipaf, a Human Caspase-1-Activating Protein Related to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 28309–28313, doi:10.1074/jbc.C100250200.
532. Gutierrez, O.; Pipaon, C.; Fernandez-Luna, J.L. Ipaf Is Upregulated by Tumor Necrosis Factor- α in Human Leukemia Cells. *FEBS Letters* **2004**, *568*, 79–82, doi:10.1016/j.febslet.2004.04.095.
533. Mariathasan, S.; Newton, K.; Monack, D.M.; Vucic, D.; French, D.M.; Lee, W.P.; Roose-Girma, M.; Erickson, S.; Dixit, V.M. Differential Activation of the Inflammasome by Caspase-1 Adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **2004**, *430*, 213–218, doi:10.1038/nature02664.
534. Miao, E.A.; Alpuche-Aranda, C.M.; Dors, M.; Clark, A.E.; Bader, M.W.; Miller, S.I.; Aderem, A. Cytoplasmic Flagellin Activates Caspase-1 and Secretion of Interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol* **2006**, *7*, 569–575, doi:10.1038/ni1344.
535. Franchi, L.; Amer, A.; Body-Malapel, M.; Kanneganti, T.-D.; Özören, N.; Jagirdar, R.; Inohara, N.; Vandenabeele, P.; Bertin, J.; Coyle, A.; et al. Cytosolic Flagellin Requires Ipaf for Activation

- of Caspase-1 and Interleukin 1 β in Salmonella-Infected Macrophages. *Nat Immunol* **2006**, *7*, 576–582, doi:10.1038/ni1346.
536. Miao, E.A.; Mao, D.P.; Yudkovsky, N.; Bonneau, R.; Lorang, C.G.; Warren, S.E.; Leaf, I.A.; Aderem, A. Innate Immune Detection of the Type III Secretion Apparatus through the NLRC4 Inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 3076–3080, doi:10.1073/pnas.0913087107.
537. Rayamajhi, M.; Zak, D.E.; Chavarria-Smith, J.; Vance, R.E.; Miao, E.A. Cutting Edge: Mouse NAIP1 Detects the Type III Secretion System Needle Protein. *J.I.* **2013**, *191*, 3986–3989, doi:10.4049/jimmunol.1301549.
538. Kortmann, J.; Brubaker, S.W.; Monack, D.M. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *J.I.* **2015**, *195*, 815–819, doi:10.4049/jimmunol.1403100.
539. Yang, J.; Zhao, Y.; Shi, J.; Shao, F. Human NAIP and Mouse NAIP1 Recognize Bacterial Type III Secretion Needle Protein for Inflammasome Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 14408–14413, doi:10.1073/pnas.1306376110.
540. Damiano, J.S.; Oliveira, V.; Welsh, K.; Reed, J.C. Heterotypic Interactions among NACHT Domains: Implications for Regulation of Innate Immune Responses. *Biochemical Journal* **2004**, *381*, 213–219, doi:10.1042/BJ20031506.
541. Hu, Z.; Yan, C.; Liu, P.; Huang, Z.; Ma, R.; Zhang, C.; Wang, R.; Zhang, Y.; Martinon, F.; Miao, D.; et al. Crystal Structure of NLRC4 Reveals Its Autoinhibition Mechanism. *Science* **2013**, *341*, 172–175, doi:10.1126/science.1236381.
542. Duncan, J.A.; Canna, S.W. The NLRC4 Inflammasome. *Immunol Rev* **2018**, *281*, 115–123, doi:10.1111/imr.12607.
543. Lu, C.; Wang, A.; Wang, L.; Dorsch, M.; Ocain, T.D.; Xu, Y. Nucleotide Binding to CARD12 and Its Role in CARD12-Mediated Caspase-1 Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *331*, 1114–1119, doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.027.
544. Qu, Y.; Misaghi, S.; Newton, K.; Maltzman, A.; Izrael-Tomasevic, A.; Arnott, D.; Dixit, V.M. NLRP3 Recruitment by NLRC4 during Salmonella Infection. *Journal of Experimental Medicine* **2016**, *213*, 877–885, doi:10.1084/jem.20132234.
545. Man, S.M.; Hopkins, L.J.; Nugent, E.; Cox, S.; Glück, I.M.; Tourlomousis, P.; Wright, J.A.; Cicuta, P.; Monie, T.P.; Bryant, C.E. Inflammasome Activation Causes Dual Recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the Same Macromolecular Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 7403–7408, doi:10.1073/pnas.1402911111.
546. Qu, Y.; Misaghi, S.; Izrael-Tomasevic, A.; Newton, K.; Gilmour, L.L.; Lamkanfi, M.; Louie, S.; Kayagaki, N.; Liu, J.; Kömüves, L.; et al. Phosphorylation of NLRC4 Is Critical for Inflammasome Activation. *Nature* **2012**, *490*, 539–542, doi:10.1038/nature11429.
547. Wang, X.; Shaw, D.K.; Hammond, H.L.; Sutterwala, F.S.; Rayamajhi, M.; Shirey, K.A.; Perkins, D.J.; Bonventre, J.V.; Velayutham, T.S.; Evans, S.M.; et al. The Prostaglandin E2-EP3 Receptor Axis Regulates Anaplasma Phagocytophilum-Mediated NLRC4 Inflammasome Activation. *PLoS Pathog* **2016**, *12*, e1005803, doi:10.1371/journal.ppat.1005803.
548. Diebolder, C.A.; Halff, E.F.; Koster, A.J.; Huizinga, E.G.; Koning, R.I. Cryoelectron Tomography of the NAIP5/NLRC4 Inflammasome: Implications for NLR Activation. *Structure* **2015**, *23*, 2349–2357, doi:10.1016/j.str.2015.10.001.
549. Amer, A.; Franchi, L.; Kanneganti, T.-D.; Body-Malapel, M.; Özören, N.; Brady, G.; Meshinchi, S.; Jagirdar, R.; Gewirtz, A.; Akira, S.; et al. Regulation of Legionella Phagosome Maturation and Infection through Flagellin and Host Ipaf. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 35217–35223, doi:10.1074/jbc.M604933200.
550. Matusiak, M.; Van Opendenbosch, N.; Vande Walle, L.; Sirard, J.-C.; Kanneganti, T.-D.; Lamkanfi, M. Flagellin-Induced NLRC4 Phosphorylation Primes the Inflammasome for Activation by NAIP5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 1541–1546, doi:10.1073/pnas.1417945112.
551. Liu, W.; Liu, X.; Li, Y.; Zhao, J.; Liu, Z.; Hu, Z.; Wang, Y.; Yao, Y.; Miller, A.W.; Su, B.; et al. LRRK2 Promotes the Activation of NLRC4 Inflammasome during Salmonella Typhimurium Infection. *Journal of Experimental Medicine* **2017**, *214*, 3051–3066, doi:10.1084/jem.20170014.
552. Masumoto, J.; Taniguchi, S.; Ayukawa, K.; Sarvotham, H.; Kishino, T.; Niikawa, N.; Hidaka, E.; Katsuyama, T.; Higuchi, T.; Sagara, J. ASC, a Novel 22-KDa Protein, Aggregates during

- Apoptosis of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 33835–33838, doi:10.1074/jbc.274.48.33835.
553. Lu, A.; Magupalli, V.G.; Ruan, J.; Yin, Q.; Atianand, M.K.; Vos, M.R.; Schröder, G.F.; Fitzgerald, K.A.; Wu, H.; Egelman, E.H. Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-Dependent Inflammasomes. *Cell* **2014**, *156*, 1193–1206, doi:10.1016/j.cell.2014.02.008.
554. Man, S.M.; Tourlomousis, P.; Hopkins, L.; Monie, T.P.; Fitzgerald, K.A.; Bryant, C.E. *Salmonella* Infection Induces Recruitment of Caspase-8 to the Inflammasome To Modulate IL-1 β Production. *J.I.* **2013**, *191*, 5239–5246, doi:10.4049/jimmunol.1301581.
555. Damiano, J.S.; Stehlik, C.; Pio, F.; Godzik, A.; Reed, J.C. CLAN, a Novel Human CED-4-like Gene. *Genomics* **2001**, *75*, 77–83, doi:10.1006/geno.2001.6579.
556. Ghayur, T.; Banerjee, S.; Hugunin, M.; Butler, D.; Herzog, L.; Carter, A.; Quintal, L.; Sekut, L.; Talanian, R.; Paskind, M.; et al. Caspase-1 Processes IFN- γ -Inducing Factor and Regulates LPS-Induced IFN- γ Production. *Nature* **1997**, *386*, 619–623, doi:10.1038/386619a0.
557. Gu, Y.; Kuida, K.; Tsutsui, H.; Ku, G.; Hsiao, K.; Fleming, M.A.; Hayashi, N.; Higashino, K.; Okamura, H.; Nakanishi, K.; et al. Activation of Interferon- γ Inducing Factor Mediated by Interleukin-1 β Converting Enzyme. *Science* **1997**, *275*, 206–209, doi:10.1126/science.275.5297.206.
558. Cayrol, C.; Girard, J.-P. The IL-1-like Cytokine IL-33 Is Inactivated after Maturation by Caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 9021–9026, doi:10.1073/pnas.0812690106.
559. Im, S.-S.; Yousef, L.; Blaschitz, C.; Liu, J.Z.; Edwards, R.A.; Young, S.G.; Raffatellu, M.; Osborne, T.F. Linking Lipid Metabolism to the Innate Immune Response in Macrophages through Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a. *Cell Metabolism* **2011**, *13*, 540–549, doi:10.1016/j.cmet.2011.04.001.
560. Ball, D.P.; Taabazuing, C.Y.; Griswold, A.R.; Orth, E.L.; Rao, S.D.; Kotliar, I.B.; Vostal, L.E.; Johnson, D.C.; Bachovchin, D.A. Caspase-1 Interdomain Linker Cleavage Is Required for Pyroptosis. *Life Sci. Alliance* **2020**, *3*, e202000664, doi:10.26508/lsa.202000664.
561. Miller, D.K.; Ayala, J.M.; Egger, L.A.; Raju, S.M.; Yamin, T.T.; Ding, G.J.; Gaffney, E.P.; Howard, A.D.; Palyha, O.C.; Rolando, A.M. Purification and Characterization of Active Human Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme from THP.1 Monocytic Cells. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 18062–18069.
562. Talanian, R.V.; Allen, H.J. Roles of Caspases in Inflammation and Apoptosis: Prospects as Drug Discovery Targets. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Elsevier, 1998; Vol. 33, pp. 273–282 ISBN 978-0-12-040533-6.
563. Jorgensen, I.; Zhang, Y.; Krantz, B.A.; Miao, E.A. Pyroptosis Triggers Pore-Induced Intracellular Traps (PITs) That Capture Bacteria and Lead to Their Clearance by Efferocytosis. *Journal of Experimental Medicine* **2016**, *213*, 2113–2128, doi:10.1084/jem.20151613.
564. Mascarenhas, D.P.A.; Cerqueira, D.M.; Pereira, M.S.F.; Castanheira, F.V.S.; Fernandes, T.D.; Manin, G.Z.; Cunha, L.D.; Zamboni, D.S. Inhibition of Caspase-1 or Gasdermin-D Enable Caspase-8 Activation in the Naip5/NLRC4/ASC Inflammasome. *PLoS Pathog* **2017**, *13*, e1006502, doi:10.1371/journal.ppat.1006502.
565. Franchi, L.; Kamada, N.; Nakamura, Y.; Burberry, A.; Kuffa, P.; Suzuki, S.; Shaw, M.H.; Kim, Y.-G.; Núñez, G. NLRC4-Driven Production of IL-1 β Discriminates between Pathogenic and Commensal Bacteria and Promotes Host Intestinal Defense. *Nat Immunol* **2012**, *13*, 449–456, doi:10.1038/ni.2263.
566. Sutterwala, F.S.; Mijares, L.A.; Li, L.; Ogura, Y.; Kazmierczak, B.I.; Flavell, R.A. Immune Recognition of *Pseudomonas Aeruginosa* Mediated by the IPAF/NLRC4 Inflammasome. *Journal of Experimental Medicine* **2007**, *204*, 3235–3245, doi:10.1084/jem.20071239.
567. Yang, J.; Zhang, E.; Liu, F.; Zhang, Y.; Zhong, M.; Li, Y.; Zhou, D.; Chen, Y.; Cao, Y.; Xiao, Y.; et al. Flagellins of *Salmonella* Typhi and Nonpathogenic *Escherichia Coli* Are Differentially Recognized through the NLRC4 Pathway in Macrophages. *J Innate Immun* **2014**, *6*, 47–57, doi:10.1159/000351476.
568. Sun, Y.-H.; Rolán, H.G.; Tsolis, R.M. Injection of Flagellin into the Host Cell Cytosol by *Salmonella Enterica* Serotype Typhimurium. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 33897–33901, doi:10.1074/jbc.C700181200.

569. Carvalho, F.A.; Nalbantoglu, I.; Aitken, J.D.; Uchiyama, R.; Su, Y.; Doho, G.H.; Vijay-Kumar, M.; Gewirtz, A.T. Cytosolic Flagellin Receptor NLRC4 Protects Mice against Mucosal and Systemic Challenges. *Mucosal Immunol* **2012**, *5*, 288–298, doi:10.1038/mi.2012.8.
570. Sundaram, B.; Kanneganti, T.-D. Advances in Understanding Activation and Function of the NLRC4 Inflammasome. *IJMS* **2021**, *22*, 1048, doi:10.3390/ijms22031048.
571. Zamboni, D.S.; Kobayashi, K.S.; Kohlsdorf, T.; Ogura, Y.; Long, E.M.; Vance, R.E.; Kuida, K.; Mariathasan, S.; Dixit, V.M.; Flavell, R.A.; et al. The Birc1e Cytosolic Pattern-Recognition Receptor Contributes to the Detection and Control of Legionella Pneumophila Infection. *Nat Immunol* **2006**, *7*, 318–325, doi:10.1038/ni1305.
572. Lamkanfi, M.; Amer, A.; Kanneganti, T.-D.; Muñoz-Planillo, R.; Chen, G.; Vandenabeele, P.; Fortier, A.; Gros, P.; Núñez, G. The Nod-Like Receptor Family Member Naip5/Birc1e Restricts *Legionella Pneumophila* Growth Independently of Caspase-1 Activation. *J Immunol* **2007**, *178*, 8022–8027, doi:10.4049/jimmunol.178.12.8022.
573. Nordlander, S.; Pott, J.; Maloy, K.J. NLRC4 Expression in Intestinal Epithelial Cells Mediates Protection against an Enteric Pathogen. *Mucosal Immunol* **2014**, *7*, 775–785, doi:10.1038/mi.2013.95.
574. von Moltke, J.; Trinidad, N.J.; Moayeri, M.; Kintzer, A.F.; Wang, S.B.; van Rooijen, N.; Brown, C.R.; Krantz, B.A.; Leppla, S.H.; Gronert, K.; et al. Rapid Induction of Inflammatory Lipid Mediators by the Inflammasome in Vivo. *Nature* **2012**, *490*, 107–111, doi:10.1038/nature11351.
575. Master, S.S.; Rampini, S.K.; Davis, A.S.; Keller, C.; Ehlers, S.; Springer, B.; Timmins, G.S.; Sander, P.; Deretic, V. Mycobacterium Tuberculosis Prevents Inflammasome Activation. *Cell Host & Microbe* **2008**, *3*, 224–232, doi:10.1016/j.chom.2008.03.003.
576. Cai, S.; Batra, S.; Wakamatsu, N.; Pacher, P.; Jeyaseelan, S. NLRC4 Inflammasome-Mediated Production of IL-1 β Modulates Mucosal Immunity in the Lung against Gram-Negative Bacterial Infection. *J.I.* **2012**, *188*, 5623–5635, doi:10.4049/jimmunol.1200195.
577. Wu, J.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.S. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 Inflammasomes in Caspase-1 Activation by *Listeria Monocytogenes*. *J Clin Immunol* **2010**, *30*, 693–702, doi:10.1007/s10875-010-9425-2.
578. Ceballos-Olvera, I.; Sahoo, M.; Miller, M.A.; Barrio, L. del; Re, F. Inflammasome-Dependent Pyroptosis and IL-18 Protect against *Burkholderia Pseudomallei* Lung Infection While IL-1 β Is Deleterious. *PLoS Pathog* **2011**, *7*, e1002452, doi:10.1371/journal.ppat.1002452.
579. Pedra, J.H.F.; Sutterwala, F.S.; Sukumaran, B.; Ogura, Y.; Qian, F.; Montgomery, R.R.; Flavell, R.A.; Fikrig, E. ASC/PYCARD and Caspase-1 Regulate the IL-18/IFN- γ Axis during *Anaplasma Phagocytophilum* Infection. *J Immunol* **2007**, *179*, 4783–4791, doi:10.4049/jimmunol.179.7.4783.
580. Karmakar, M.; Sun, Y.; Hise, A.G.; Rietsch, A.; Pearlman, E. Cutting Edge: IL-1 β Processing during *Pseudomonas Aeruginosa* Infection Is Mediated by Neutrophil Serine Proteases and Is Independent of NLRC4 and Caspase-1. *J.I.* **2012**, *189*, 4231–4235, doi:10.4049/jimmunol.1201447.
581. Chen, K.W.; Groß, C.J.; Sotomayor, F.V.; Stacey, K.J.; Tschopp, J.; Sweet, M.J.; Schroder, K. The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Reports* **2014**, *8*, 570–582, doi:10.1016/j.celrep.2014.06.028.
582. Masumoto, J.; Taniguchi, S.; Nakayama, J.; Shiohara, M.; Hidaka, E.; Katsuyama, T.; Murase, S.; Sagara, J. Expression of Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain, a Pyrin N-Terminal Homology Domain-Containing Protein, in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem.* **2001**, *49*, 1269–1275, doi:10.1177/002215540104901009.
583. Conway, K.E.; McConnell, B.B.; Bowring, C.E.; Donald, C.D.; Warren, S.T.; Vertino, P.M. TMS1, a Novel Proapoptotic Caspase Recruitment Domain Protein, Is a Target of Methylation-Induced Gene Silencing in Human Breast Cancers. *Cancer Res* **2000**, *60*, 6236–6242.
584. Guo, H.; Callaway, J.B.; Ting, J.P.-Y. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nat Med* **2015**, *21*, 677–687, doi:10.1038/nm.3893.

585. Man, S.M.; Karki, R.; Kanneganti, T.-D. Molecular Mechanisms and Functions of Pyroptosis, Inflammatory Caspases and Inflammasomes in Infectious Diseases. *Immunol Rev* **2017**, *277*, 61–75, doi:10.1111/imr.12534.
586. Black, R.A.; Kronheim, S.R.; Sleath, P.R. Activation of Interleukin-1 β by a Co-Induced Protease. *FEBS Letters* **1989**, *247*, 386–390, doi:10.1016/0014-5793(89)81376-6.
587. Kostura, M.J.; Tocci, M.J.; Limjuco, G.; Chin, J.; Cameron, P.; Hillman, A.G.; Chartrain, N.A.; Schmidt, J.A. Identification of a Monocyte Specific Pre-Interleukin 1 Beta Convertase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 5227–5231, doi:10.1073/pnas.86.14.5227.
588. Alnemri, E.S.; Livingston, D.J.; Nicholson, D.W.; Salvesen, G.; Thornberry, N.A.; Wong, W.W.; Yuan, J. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* **1996**, *87*, 171, doi:10.1016/S0092-8674(00)81334-3.
589. Ramirez, M.L.G.; Salvesen, G.S. A Primer on Caspase Mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2018**, *82*, 79–85, doi:10.1016/j.semcdb.2018.01.002.
590. Galluzzi, L.; López-Soto, A.; Kumar, S.; Kroemer, G. Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* **2016**, *44*, 221–231, doi:10.1016/j.immuni.2016.01.020.
591. Denecker, G.; Hoste, E.; Gilbert, B.; Hochepped, T.; Ovaere, P.; Lippens, S.; Van den Broecke, C.; Van Damme, P.; D’Herde, K.; Hachem, J.-P.; et al. Caspase-14 Protects against Epidermal UVB Photodamage and Water Loss. *Nat Cell Biol* **2007**, *9*, 666–674, doi:10.1038/ncb1597.
592. Hoste, E.; Kemperman, P.; Devos, M.; Denecker, G.; Kezic, S.; Yau, N.; Gilbert, B.; Lippens, S.; De Groote, P.; Roelandt, R.; et al. Caspase-14 Is Required for Filaggrin Degradation to Natural Moisturizing Factors in the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2011**, *131*, 2233–2241, doi:10.1038/jid.2011.153.
593. Seidelin, J.B.; Sträter, J.; Nielsen, O.H. Caspase 14 Does Not Influence Intestinal Epithelial Cell Differentiation. *Cell Death Differ* **2013**, *20*, 524–524, doi:10.1038/cdd.2012.164.
594. Lamkanfi, M. Alice in Caspase Land. A Phylogenetic Analysis of Caspases from Worm to Man. *Cell death differ.* **2002**, *9*, 358–361, doi:10.1038/sj.cdd.4400989.
595. Park, H.H.; Lo, Y.-C.; Lin, S.-C.; Wang, L.; Yang, J.K.; Wu, H. The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 561–586, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656.
596. Henry, C.M.; Martin, S.J. Caspase-8 Acts in a Non-Enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-Inflammatory “FADDosome” Complex upon TRAIL Stimulation. *Molecular Cell* **2017**, *65*, 715-729.e5, doi:10.1016/j.molcel.2017.01.022.
597. Van Opdenbosch, N.; Lamkanfi, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity* **2019**, *50*, 1352–1364, doi:10.1016/j.immuni.2019.05.020.
598. Bratton, S.B.; Salvesen, G.S. Regulation of the Apaf-1–Caspase-9 Apoptosome. *Journal of Cell Science* **2010**, *123*, 3209–3214, doi:10.1242/jcs.073643.
599. Lavrik, I.N.; Krammer, P.H. Regulation of CD95/Fas Signaling at the DISC. *Cell Death Differ* **2012**, *19*, 36–41, doi:10.1038/cdd.2011.155.
600. Cornelis, S.; Kersse, K.; Festjens, N.; Lamkanfi, M.; Vandenamee, P. Inflammatory Caspases: Targets for Novel Therapies. *CPD* **2007**, *13*, 367–385, doi:10.2174/138161207780163006.
601. Yazdi, A.S.; Guarda, G.; D’Ombain, M.C.; Drexler, S.K. Inflammatory Caspases in Innate Immunity and Inflammation. *J Innate Immun* **2010**, *2*, 228–237, doi:10.1159/000283688.
602. Kuida, K.; Lippke, J.A.; Ku, G.; Harding, M.W.; Livingston, D.J.; Su, M.S.-S.; Flavell, R.A. Altered Cytokine Export and Apoptosis in Mice Deficient in Interleukin-1 β Converting Enzyme. *Science* **1995**, *267*, 2000–2003, doi:10.1126/science.7535475.
603. Wang, S.; Miura, M.; Jung, Y.; Zhu, H.; Li, E.; Yuan, J. Murine Caspase-11, an ICE-Interacting Protease, Is Essential for the Activation of ICE. *Cell* **1998**, *92*, 501–509, doi:10.1016/S0092-8674(00)80943-5.
604. Wang, P.; Arjona, A.; Zhang, Y.; Sultana, H.; Dai, J.; Yang, L.; LeBlanc, P.M.; Doiron, K.; Saleh, M.; Fikrig, E. Caspase-12 Controls West Nile Virus Infection via the Viral RNA Receptor RIG-I. *Nat Immunol* **2010**, *11*, 912–919, doi:10.1038/ni.1933.
605. Lamkanfi, M. Emerging Inflammasome Effector Mechanisms. *Nat Rev Immunol* **2011**, *11*, 213–220, doi:10.1038/nri2936.

606. Kesavardhana, S.; Kanneganti, T.-D. Mechanisms Governing Inflammasome Activation, Assembly and Pyroptosis Induction. *International Immunology* **2017**, *29*, 201–210, doi:10.1093/intimm/dxx018.
607. Elliott, J.M.; Rouge, L.; Wiesmann, C.; Scheer, J.M. Crystal Structure of Procaspace-1 Zymogen Domain Reveals Insight into Inflammatory Caspase Autoactivation. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 6546–6553, doi:10.1074/jbc.M806121200.
608. Broz, P.; von Moltke, J.; Jones, J.W.; Vance, R.E.; Monack, D.M. Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. *Cell Host & Microbe* **2010**, *8*, 471–483, doi:10.1016/j.chom.2010.11.007.
609. Van Opdenbosch, N.; Gurung, P.; Vande Walle, L.; Fossoul, A.; Kanneganti, T.-D.; Lamkanfi, M. Activation of the NLRP1b Inflammasome Independently of ASC-Mediated Caspase-1 Autoproteolysis and Speck Formation. *Nat Commun* **2014**, *5*, 3209, doi:10.1038/ncomms4209.
610. Cerretti, D.P.; Kozlosky, C.J.; Mosley, B.; Nelson, N.; Van Ness, K.; Greenstreet, T.A.; March, C.J.; Kronheim, S.R.; Druck, T.; Cannizzaro, L.A.; et al. Molecular Cloning of the Interleukin-1 β Converting Enzyme. *Science* **1992**, *256*, 97–100, doi:10.1126/science.1373520.
611. Chen, X.; He, W.; Hu, L.; Li, J.; Fang, Y.; Wang, X.; Xu, X.; Wang, Z.; Huang, K.; Han, J. Pyroptosis Is Driven by Non-Selective Gasdermin-D Pore and Its Morphology Is Different from MLKL Channel-Mediated Necroptosis. *Cell Res* **2016**, *26*, 1007–1020, doi:10.1038/cr.2016.100.
612. Wolf, A.J.; Reyes, C.N.; Liang, W.; Becker, C.; Shimada, K.; Wheeler, M.L.; Cho, H.C.; Popescu, N.I.; Coggeshall, K.M.; Arditi, M.; et al. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* **2016**, *166*, 624–636, doi:10.1016/j.cell.2016.05.076.
613. Gaidt, M.M.; Ebert, T.S.; Chauhan, D.; Schmidt, T.; Schmid-Burgk, J.L.; Rapino, F.; Robertson, A.A.B.; Cooper, M.A.; Graf, T.; Hornung, V. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* **2016**, *44*, 833–846, doi:10.1016/j.immuni.2016.01.012.
614. Evavold, C.L.; Ruan, J.; Tan, Y.; Xia, S.; Wu, H.; Kagan, J.C. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* **2018**, *48*, 35–44.e6, doi:10.1016/j.immuni.2017.11.013.
615. Rühl, S.; Shkarina, K.; Demarco, B.; Heilig, R.; Santos, J.C.; Broz, P. ESCRT-Dependent Membrane Repair Negatively Regulates Pyroptosis Downstream of GSDMD Activation. *Science* **2018**, *362*, 956–960, doi:10.1126/science.aar7607.
616. Kambara, H.; Liu, F.; Zhang, X.; Liu, P.; Bajrami, B.; Teng, Y.; Zhao, L.; Zhou, S.; Yu, H.; Zhou, W.; et al. Gasdermin D Exerts Anti-Inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. *Cell Reports* **2018**, *22*, 2924–2936, doi:10.1016/j.celrep.2018.02.067.
617. Chen, K.W.; Demarco, B.; Heilig, R.; Shkarina, K.; Boettcher, A.; Farady, C.J.; Pelczar, P.; Broz, P. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Activate Pannexin-1 to Drive NLRP 3 Inflammasome Assembly. *EMBO J* **2019**, *38*, doi:10.15252/emboj.2019101638.
618. Taabazuing, C.Y.; Okondo, M.C.; Bachovchin, D.A. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chemical Biology* **2017**, *24*, 507–514.e4, doi:10.1016/j.chembiol.2017.03.009.
619. Liu, Z.; Wang, C.; Rathkey, J.K.; Yang, J.; Dubyak, G.R.; Abbott, D.W.; Xiao, T.S. Structures of the Gasdermin D C-Terminal Domains Reveal Mechanisms of Autoinhibition. *Structure* **2018**, *26*, 778–784.e3, doi:10.1016/j.str.2018.03.002.
620. Kang, R.; Zeng, L.; Zhu, S.; Xie, Y.; Liu, J.; Wen, Q.; Cao, L.; Xie, M.; Ran, Q.; Kroemer, G.; et al. Lipid Peroxidation Drives Gasdermin D-Mediated Pyroptosis in Lethal Polymicrobial Sepsis. *Cell Host & Microbe* **2018**, *24*, 97–108.e4, doi:10.1016/j.chom.2018.05.009.
621. Mulvihill, E.; Sborgi, L.; Mari, S.A.; Pfreundschuh, M.; Hiller, S.; Müller, D.J. Mechanism of Membrane Pore Formation by Human Gasdermin-D. *EMBO J* **2018**, *37*, doi:10.15252/emboj.201798321.
622. Dinarello, C.A. Interleukin-1 in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Diseases. *Blood* **2011**, *117*, 3720–3732, doi:10.1182/blood-2010-07-273417.
623. Sahoo, M.; Ceballos-Olvera, I.; del Barrio, L.; Re, F. Role of the Inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in Bacterial Infections. *The Scientific World JOURNAL* **2011**, *11*, 2037–2050, doi:10.1100/2011/212680.

624. Afonina, I.S.; Müller, C.; Martin, S.J.; Beyaert, R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* **2015**, *42*, 991–1004, doi:10.1016/j.immuni.2015.06.003.
625. Howard, A.D.; Chartrain, N.; Ding, G.F.; Kostura, M.J.; Limjuco, G.; Schmidt, J.A.; Tocci, M.J. Probing the Role of Interleukin-1 Beta Convertase in Interleukin-1 Beta Secretion. *Agents Actions Suppl* **1991**, *35*, 77–83.
626. Thornberry, N.A.; Bull, H.G.; Calaycay, J.R.; Chapman, K.T.; Howard, A.D.; Kostura, M.J.; Miller, D.K.; Molineaux, S.M.; Weidner, J.R.; Aunins, J.; et al. A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1 β processing in Monocytes. *Nature* **1992**, *356*, 768–774, doi:10.1038/356768a0.
627. Li, P.; Allen, H.; Banerjee, S.; Franklin, S.; Herzog, L.; Johnston, C.; McDowell, J.; Paskind, M.; Rodman, L.; Salfeld, J.; et al. Mice Deficient in IL-1 β -Converting Enzyme Are Defective in Production of Mature IL-1 β and Resistant to Endotoxic Shock. *Cell* **1995**, *80*, 401–411, doi:10.1016/0092-8674(95)90490-5.
628. Tsutsui, H.; Kayagaki, N.; Kuida, K.; Nakano, H.; Hayashi, N.; Takeda, K.; Matsui, K.; Kashiwamura, S.-I.; Hada, T.; Akira, S.; et al. Caspase-1-Independent, Fas/Fas Ligand-Mediated IL-18 Secretion from Macrophages Causes Acute Liver Injury in Mice. *Immunity* **1999**, *11*, 359–367, doi:10.1016/S1074-7613(00)80111-9.
629. Bossaller, L.; Chiang, P.-I.; Schmidt-Lauber, C.; Ganesan, S.; Kaiser, W.J.; Rathinam, V.A.K.; Mocarski, E.S.; Subramanian, D.; Green, D.R.; Silverman, N.; et al. Cutting Edge: FAS (CD95) Mediates Noncanonical IL-1 β and IL-18 Maturation via Caspase-8 in an RIP3-Independent Manner. *J.I.* **2012**, *189*, 5508–5512, doi:10.4049/jimmunol.1202121.
630. Okamura, H.; Nagata, K.; Komatsu, T.; Tanimoto, T.; Nukata, Y.; Tanabe, F.; Akita, K.; Torigoe, K.; Okura, T.; Fukuda, S. A Novel Costimulatory Factor for Gamma Interferon Induction Found in the Livers of Mice Causes Endotoxic Shock. *Infect Immun* **1995**, *63*, 3966–3972, doi:10.1128/iai.63.10.3966-3972.1995.
631. Ushio, S.; Namba, M.; Okura, T.; Hattori, K.; Nukada, Y.; Akita, K.; Tanabe, F.; Konishi, K.; Micallef, M.; Fujii, M.; et al. Cloning of the cDNA for Human IFN-Gamma-Inducing Factor, Expression in Escherichia Coli, and Studies on the Biologic Activities of the Protein. *J Immunol* **1996**, *156*, 4274–4279.
632. Companjen, A.R.; van der Velden, V.H.; Vooy, A.; Debets, R.; Benner, R.; Prens, E.P. Human Keratinocytes Are Major Producers of IL-18: Predominant Expression of the Unprocessed Form. *Eur Cytokine Netw* **2000**, *11*, 383–390.
633. Omoto, Y.; Tokime, K.; Yamanaka, K.; Habe, K.; Morioka, T.; Kurokawa, I.; Tsutsui, H.; Yamanishi, K.; Nakanishi, K.; Mizutani, H. Human Mast Cell Chymase Cleaves Pro-IL-18 and Generates a Novel and Biologically Active IL-18 Fragment. *J Immunol* **2006**, *177*, 8315–8319, doi:10.4049/jimmunol.177.12.8315.
634. Hazuda, D.J.; Strickler, J.; Simon, P.; Young, P.R. Structure-Function Mapping of Interleukin 1 Precursors. Cleavage Leads to a Conformational Change in the Mature Protein. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 7081–7086.
635. Sugawara, S.; Uehara, A.; Nochi, T.; Yamaguchi, T.; Ueda, H.; Sugiyama, A.; Hanzawa, K.; Kumagai, K.; Okamura, H.; Takada, H. Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by Human Oral Epithelial Cells. *J Immunol* **2001**, *167*, 6568–6575, doi:10.4049/jimmunol.167.11.6568.
636. Oboki, K.; Ohno, T.; Kajiwar, N.; Saito, H.; Nakae, S. IL-33 and IL-33 Receptors in Host Defense and Diseases. *Allergy International* **2010**, *59*, 143–160, doi:10.2332/allergolint.10-RAI-0186.
637. Halim, T.Y.F.; Krauß, R.H.; Sun, A.C.; Takei, F. Lung Natural Helper Cells Are a Critical Source of Th2 Cell-Type Cytokines in Protease Allergen-Induced Airway Inflammation. *Immunity* **2012**, *36*, 451–463, doi:10.1016/j.immuni.2011.12.020.
638. Garlanda, C.; Dinarello, C.A.; Mantovani, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* **2013**, *39*, 1003–1018, doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010.
639. Pei, C.; Barbour, M.; Fairlie-Clarke, K.J.; Allan, D.; Mu, R.; Jiang, H.-R. Emerging Role of Interleukin-33 in Autoimmune Diseases. *Immunology* **2014**, *141*, 9–17, doi:10.1111/imm.12174.
640. Schmitz, J.; Owyang, A.; Oldham, E.; Song, Y.; Murphy, E.; McClanahan, T.K.; Zurawski, G.; Moshrefi, M.; Qin, J.; Li, X.; et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine That Signals via the IL-

- 1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity* **2005**, *23*, 479–490, doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015.
641. Lüthi, A.U.; Cullen, S.P.; McNeela, E.A.; Duriez, P.J.; Afonina, I.S.; Sheridan, C.; Brumatti, G.; Taylor, R.C.; Kersse, K.; Vandenabeele, P.; et al. Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. *Immunity* **2009**, *31*, 84–98, doi:10.1016/j.immuni.2009.05.007.
642. Ali, S.; Nguyen, D.Q.; Falk, W.; Martin, M.U. Caspase 3 Inactivates Biologically Active Full Length Interleukin-33 as a Classical Cytokine but Does Not Prohibit Nuclear Translocation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *391*, 1512–1516, doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.107.
643. Martin, S.J.; Henry, C.M.; Cullen, S.P. A Perspective on Mammalian Caspases as Positive and Negative Regulators of Inflammation. *Molecular Cell* **2012**, *46*, 387–397, doi:10.1016/j.molcel.2012.04.026.
644. Adcock, I.M.; Caramori, G. Transcription Factors. In *Asthma and COPD*; Elsevier, 2009; pp. 373–380 ISBN 978-0-12-374001-4.
645. Reed, J.C.; Doctor, K.; Rojas, A.; Zapata, J.M.; Stehlik, C.; Fiorentino, L.; Damiano, J.; Roth, W.; Matsuzawa, S.; Newman, R.; et al. Comparative Analysis of Apoptosis and Inflammation Genes of Mice and Humans. *Genome Res.* **2003**, *13*, 1376–1388, doi:10.1101/gr.1053803.
646. Hong, G.-S.; Jung, Y.-K. Caspase Recruitment Domain (CARD) as a Bi-Functional Switch of Caspase Regulation and NF- κ B Signals. *BMB Reports* **2002**, *35*, 19–23, doi:10.5483/BMBRep.2002.35.1.019.
647. Bouchier-Hayes, L.; Martin, S.J. CARDINAL Roles in Apoptosis and NF κ B Activation. In *Vitamins & Hormones*; Elsevier, 2004; Vol. 67, pp. 133–147 ISBN 978-0-12-709867-8.
648. Sun, Y.; Wang, J.; Lao, H.; Yin, Z.; He, W.; Weng, S.; Yu, X.; Chan, S.; He, J. Molecular Cloning and Expression Analysis of the ASC Gene from Mandarin Fish and Its Regulation of NF- κ B Activation. *Developmental & Comparative Immunology* **2008**, *32*, 391–399, doi:10.1016/j.dci.2007.07.006.
649. Adrain, C.; Martin, S.J. The Mitochondrial Apoptosome: A Killer Unleashed by the Cytochrome *c*. *Trends in Biochemical Sciences* **2001**, *26*, 390–397, doi:10.1016/S0968-0004(01)01844-8.
650. Bertin, J.; Nir, W.-J.; Fischer, C.M.; Tayber, O.V.; Errada, P.R.; Grant, J.R.; Keilty, J.J.; Gosselin, M.L.; Robison, K.E.; Wong, G.H.W.; et al. Human CARD4 Protein Is a Novel CED-4/Apaf-1 Cell Death Family Member That Activates NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 12955–12958, doi:10.1074/jbc.274.19.12955.
651. Inohara, N.; Koseki, T.; del Peso, L.; Hu, Y.; Yee, C.; Chen, S.; Carrio, R.; Merino, J.; Liu, D.; Ni, J.; et al. Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor- κ B. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 14560–14567, doi:10.1074/jbc.274.21.14560.
652. Ogura, Y.; Inohara, N.; Benito, A.; Chen, F.F.; Yamaoka, S.; Núñez, G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 4812–4818, doi:10.1074/jbc.M008072200.
653. Inohara, N.; del Peso, L.; Koseki, T.; Chen, S.; Núñez, G. RICK, a Novel Protein Kinase Containing a Caspase Recruitment Domain, Interacts with CLARP and Regulates CD95-Mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 12296–12300, doi:10.1074/jbc.273.20.12296.
654. Inohara, N.; Koseki, T.; Lin, J.; del Peso, L.; Lucas, P.C.; Chen, F.F.; Ogura, Y.; Núñez, G. An Induced Proximity Model for NF- κ B Activation in the Nod1/RICK and RIP Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 27823–27831, doi:10.1074/jbc.M003415200.
655. Inohara, N.; Ogura, Y.; Chen, F.F.; Muto, A.; Nuñez, G. Human Nod1 Confers Responsiveness to Bacterial Lipopolysaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 2551–2554, doi:10.1074/jbc.M009728200.
656. Philpott, D.J.; Yamaoka, S.; Israëli, A.; Sansonetti, P.J. Invasive *Shigella Flexneri* Activates NF- κ B Through a Lipopolysaccharide-Dependent Innate Intracellular Response and Leads to IL-8 Expression in Epithelial Cells. *J Immunol* **2000**, *165*, 903–914, doi:10.4049/jimmunol.165.2.903.
657. Hampe, J.; Cuthbert, A.; Croucher, P.J.; Mirza, M.M.; Mascheretti, S.; Fisher, S.; Frenzel, H.; King, K.; Hasselmeier, A.; MacPherson, A.J.; et al. Association between Insertion Mutation in

- NOD2 Gene and Crohn's Disease in German and British Populations. *The Lancet* **2001**, 357, 1925–1928, doi:10.1016/S0140-6736(00)05063-7.
658. Hugot, J.-P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J.-P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk, C.; O'Morain, C.A.; Gassull, M.; et al. Association of NOD2 Leucine-Rich Repeat Variants with Susceptibility to Crohn's Disease. *Nature* **2001**, 411, 599–603, doi:10.1038/35079107.
659. Ogura, Y.; Bonen, D.K.; Inohara, N.; Nicolae, D.L.; Chen, F.F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R.H.; et al. A Frameshift Mutation in NOD2 Associated with Susceptibility to Crohn's Disease. *Nature* **2001**, 411, 603–606, doi:10.1038/35079114.
660. Willis, T.G.; Jadayel, D.M.; Du, M.-Q.; Peng, H.; Perry, A.R.; Abdul-Rauf, M.; Price, H.; Karran, L.; Majekodunmi, O.; Wlodarska, I.; et al. Bcl10 Is Involved in t(1;14)(P22;Q32) of MALT B Cell Lymphoma and Mutated in Multiple Tumor Types. *Cell* **1999**, 96, 35–45, doi:10.1016/S0092-8674(00)80957-5.
661. Lucas, P.C.; Yonezumi, M.; Inohara, N.; McAllister-Lucas, L.M.; Abazeed, M.E.; Chen, F.F.; Yamaoka, S.; Seto, M.; Núñez, G. Bcl10 and MALT1, Independent Targets of Chromosomal Translocation in MALT Lymphoma, Cooperate in a Novel NF-KB Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 19012–19019, doi:10.1074/jbc.M009984200.
662. Bertin, J.; Guo, Y.; Wang, L.; Srinivasula, S.M.; Jacobson, M.D.; Poyet, J.-L.; Merriam, S.; Du, M.-Q.; Dyer, M.J.S.; Robison, K.E.; et al. CARD9 Is a Novel Caspase Recruitment Domain-Containing Protein That Interacts With BCL10/CLAP and Activates NF-KB. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 41082–41086, doi:10.1074/jbc.C000726200.
663. Wang, L.; Guo, Y.; Huang, W.-J.; Ke, X.; Poyet, J.-L.; Manji, G.A.; Merriam, S.; Glucksmann, M.A.; DiStefano, P.S.; Alnemri, E.S.; et al. CARD10 Is a Novel Caspase Recruitment Domain/Membrane-Associated Guanylate Kinase Family Member That Interacts with BCL10 and Activates NF-KB. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 21405–21409, doi:10.1074/jbc.M102488200.
664. Bertin, J.; Wang, L.; Guo, Y.; Jacobson, M.D.; Poyet, J.-L.; Srinivasula, S.M.; Merriam, S.; DiStefano, P.S.; Alnemri, E.S. CARD11 and CARD14 Are Novel Caspase Recruitment Domain (CARD)/Membrane-Associated Guanylate Kinase (MAGUK) Family Members That Interact with BCL10 and Activate NF-KB. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 11877–11882, doi:10.1074/jbc.M010512200.
665. Gaide, O.; Martinon, F.; Micheau, O.; Bonnet, D.; Thome, M.; Tschopp, J. Carma1, a CARD-Containing Binding Partner of Bcl10, Induces Bcl10 Phosphorylation and NF-KB Activation¹. *FEBS Letters* **2001**, 496, 121–127, doi:10.1016/S0014-5793(01)02414-0.
666. McAllister-Lucas, L.M.; Inohara, N.; Lucas, P.C.; Ruland, J.; Benito, A.; Li, Q.; Chen, S.; Chen, F.F.; Yamaoka, S.; Verma, I.M.; et al. Bimp1, a MAGUK Family Member Linking Protein Kinase C Activation to Bcl10-Mediated NF-KB Induction. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 30589–30597, doi:10.1074/jbc.M103824200.
667. Kobayashi, K.; Inohara, N.; Hernandez, L.D.; Galán, J.E.; Núñez, G.; Janeway, C.A.; Medzhitov, R.; Flavell, R.A. RICK/Rip2/CARDIAK Mediates Signalling for Receptors of the Innate and Adaptive Immune Systems. *Nature* **2002**, 416, 194–199, doi:10.1038/416194a.
668. Zhou, H.; Wertz, I.; O'Rourke, K.; Ultsch, M.; Seshagiri, S.; Eby, M.; Xiao, W.; Dixit, V.M. Bcl10 Activates the NF-KB Pathway through Ubiquitination of NEMO. *Nature* **2004**, 427, 167–171, doi:10.1038/nature02273.
669. Koseki, T.; Inohara, N.; Chen, S.; Núñez, G. ARC, an Inhibitor of Apoptosis Expressed in Skeletal Muscle and Heart That Interacts Selectively with Caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 5156–5160, doi:10.1073/pnas.95.9.5156.
670. Amaral, M.P.; Bortoluci, K.R. Caspase-8 and FADD: Where Cell Death and Inflammation Collide. *Immunity* **2020**, 52, 890–892, doi:10.1016/j.immuni.2020.05.008.
671. Proell, M.; Gerlic, M.; Mace, P.D.; Reed, J.C.; Riedl, S.J. The CARD Plays a Critical Role in ASC Foci Formation and Inflammasome Signalling. *Biochemical Journal* **2013**, 449, 613–621, doi:10.1042/BJ20121198.
672. Srinivasula, S.M.; Poyet, J.-L.; Razmara, M.; Datta, P.; Zhang, Z.; Alnemri, E.S. The PYRIN-CARD Protein ASC Is an Activating Adaptor for Caspase-1. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 21119–21122, doi:10.1074/jbc.C200179200.

673. Case, C.L.; Roy, C.R. Asc Modulates the Function of NLRC4 in Response to Infection of Macrophages by *Legionella Pneumophila*. *mBio* **2011**, *2*, e00117-11, doi:10.1128/mBio.00117-11.
674. Boucher, D.; Monteleone, M.; Coll, R.C.; Chen, K.W.; Ross, C.M.; Teo, J.L.; Gomez, G.A.; Holley, C.L.; Bierschenk, D.; Stacey, K.J.; et al. Caspase-1 Self-Cleavage Is an Intrinsic Mechanism to Terminate Inflammasome Activity. *Journal of Experimental Medicine* **2018**, *215*, 827–840, doi:10.1084/jem.20172222.
675. Masumoto, J.; Dowds, T.A.; Schaner, P.; Chen, F.F.; Ogura, Y.; Li, M.; Zhu, L.; Katsuyama, T.; Sagara, J.; Taniguchi, S.; et al. ASC Is an Activating Adaptor for NF-KB and Caspase-8-Dependent Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *303*, 69–73, doi:10.1016/S0006-291X(03)00309-7.
676. Hasegawa, M.; Imamura, R.; Kinoshita, T.; Matsumoto, N.; Masumoto, J.; Inohara, N.; Suda, T. ASC-Mediated NF-KB Activation Leading to Interleukin-8 Production Requires Caspase-8 and Is Inhibited by CLARP. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 15122–15130, doi:10.1074/jbc.M412284200.
677. Humke, E.W.; Shriver, S.K.; Starovasnik, M.A.; Fairbrother, W.J.; Dixit, V.M. ICEBERG. *Cell* **2000**, *103*, 99–111, doi:10.1016/S0092-8674(00)00108-2.
678. Druilhe, A.; Srinivasula, S.M.; Razmara, M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S. Regulation of IL-1 β Generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, Two Dominant Negative Caspase Recruitment Domain Proteins. *Cell Death Differ* **2001**, *8*, 649–657, doi:10.1038/sj.cdd.4400881.
679. Lee, S.H.; Stehlik, C.; Reed, J.C. COP, a Caspase Recruitment Domain-Containing Protein and Inhibitor of Caspase-1 Activation Processing. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 34495–34500, doi:10.1074/jbc.M101415200.
680. Qiao, Y.; Wang, P.; Qi, J.; Zhang, L.; Gao, C. TLR-Induced NF-KB Activation Regulates NLRP3 Expression in Murine Macrophages. *FEBS Letters* **2012**, *586*, 1022–1026, doi:10.1016/j.febslet.2012.02.045.
681. Kim, J.; Ahn, H.; Yu, S.; Ahn, J.-H.; Ko, H.-J.; Kweon, M.-N.; Hong, E.-J.; An, B.-S.; Lee, E.; Lee, G.-S. I κ B ζ Controls NLRP3 Inflammasome Activation via Upregulation of the Nlrp3 Gene. *Cytokine* **2020**, *127*, 154983, doi:10.1016/j.cyto.2019.154983.
682. Langlais, D.; Barreiro, L.B.; Gros, P. The Macrophage IRF8/IRF1 Regulome Is Required for Protection against Infections and Is Associated with Chronic Inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **2016**, *213*, 585–603, doi:10.1084/jem.20151764.
683. Fortier, A.; Doiron, K.; Saleh, M.; Grinstein, S.; Gros, P. Restriction of *Legionella Pneumophila* Replication in Macrophages Requires Concerted Action of the Transcriptional Regulators Irf1 and Irf8 and Nod-Like Receptors Naip5 and Nlr4. *Infect Immun* **2009**, *77*, 4794–4805, doi:10.1128/IAI.01546-08.
684. McDaniel, M.M.; Kottyan, L.C.; Singh, H.; Pasare, C. Suppression of Inflammasome Activation by IRF8 and IRF4 in CDCs Is Critical for T Cell Priming. *Cell Reports* **2020**, *31*, 107604, doi:10.1016/j.celrep.2020.107604.
685. Ghosh, S.; Wallerath, C.; Covarrubias, S.; Hornung, V.; Carpenter, S.; Fitzgerald, K.A. The PYHIN Protein P205 Regulates the Inflammasome by Controlling Asc Expression. *J.I.* **2017**, *199*, 3249–3260, doi:10.4049/jimmunol.1700823.
686. Benaoudia, S.; Martin, A.; Puig Gamez, M.; Gay, G.; Lagrange, B.; Cornut, M.; Krasnykov, K.; Claude, J.; Bourgeois, C.F.; Hughes, S.; et al. A Genome-wide Screen Identifies IRF2 as a Key Regulator of Caspase-4 in Human Cells. *EMBO Rep* **2019**, *20*, doi:10.15252/embr.201948235.
687. Fairfax, B.P.; Humburg, P.; Makino, S.; Naranbhai, V.; Wong, D.; Lau, E.; Jostins, L.; Plant, K.; Andrews, R.; McGee, C.; et al. Innate Immune Activity Conditions the Effect of Regulatory Variants upon Monocyte Gene Expression. *Science* **2014**, *343*, 1246949, doi:10.1126/science.1246949.
688. Dai, C.; Krantz, S.B. Interferon Gamma Induces Upregulation and Activation of Caspases 1, 3, and 8 to Produce Apoptosis in Human Erythroid Progenitor Cells. *Blood* **1999**, *93*, 3309–3316.
689. Kayagaki, N.; Lee, B.L.; Stowe, I.B.; Kornfeld, O.S.; O'Rourke, K.; Mirrashidi, K.M.; Haley, B.; Watanabe, C.; Roose-Girma, M.; Modrusan, Z.; et al. IRF2 Transcriptionally Induces *GSDMD* Expression for Pyroptosis. *Sci. Signal.* **2019**, *12*, eaax4917, doi:10.1126/scisignal.aax4917.

690. Cuesta, N.; Nhu, Q.M.; Zudaire, E.; Polumuri, S.; Cuttitta, F.; Vogel, S.N. IFN Regulatory Factor-2 Regulates Macrophage Apoptosis through a STAT1/3- and Caspase-1-Dependent Mechanism. *J Immunol* **2007**, *178*, 3602–3611, doi:10.4049/jimmunol.178.6.3602.
691. Lv, D.-W.; Zhang, K.; Li, R. Interferon Regulatory Factor 8 Regulates Caspase-1 Expression to Facilitate Epstein-Barr Virus Reactivation in Response to B Cell Receptor Stimulation and Chemical Induction. *PLoS Pathog* **2018**, *14*, e1006868, doi:10.1371/journal.ppat.1006868.
692. Thome, M.; Hofmann, K.; Burns, K.; Martinon, F.; Bodmer, J.-L.; Mattmann, C.; Tschopp, J. Identification of CARDIAK, a RIP-like Kinase That Associates with Caspase-1. *Current Biology* **1998**, *8*, 885–889, doi:10.1016/S0960-9822(07)00352-1.
693. Chin, A.I.; Dempsey, P.W.; Bruhn, K.; Miller, J.F.; Xu, Y.; Cheng, G. Involvement of Receptor-Interacting Protein 2 in Innate and Adaptive Immune Responses. *Nature* **2002**, *416*, 190–194, doi:10.1038/416190a.
694. Yang, H.-J.; Wang, M.; Wang, L.; Cheng, B.-F.; Lin, X.-Y.; Feng, Z.-W. NF- κ B Regulates Caspase-4 Expression and Sensitizes Neuroblastoma Cells to Fas-Induced Apoptosis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117953, doi:10.1371/journal.pone.0117953.
695. Lin, X.Y.; Choi, M.S.K.; Porter, A.G. Expression Analysis of the Human Caspase-1 Subfamily Reveals Specific Regulation of the CASP5 Gene by Lipopolysaccharide and Interferon- γ . *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 39920–39926, doi:10.1074/jbc.M007255200.
696. Casson, C.N.; Yu, J.; Reyes, V.M.; Taschuk, F.O.; Yadav, A.; Copenhaver, A.M.; Nguyen, H.T.; Collman, R.G.; Shin, S. Human Caspase-4 Mediates Noncanonical Inflammasome Activation against Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 6688–6693, doi:10.1073/pnas.1421699112.
697. Eckhart, L.; Kittel, C.; Gawlas, S.; Gruber, F.; Mildner, M.; Jilma, B.; Tschachler, E. Identification of a Novel Exon Encoding the Amino-Terminus of the Predominant Caspase-5 Variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *348*, 682–688, doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.104.
698. Salskov-Iversen, M.L.; Johansen, C.; Kragballe, K.; Iversen, L. Caspase-5 Expression Is Upregulated in Lesional Psoriatic Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2011**, *131*, 670–676, doi:10.1038/jid.2010.370.
699. Schauvliege, R.; Vanrobaeys, J.; Schotte, P.; Beyaert, R. Caspase-11 Gene Expression in Response to Lipopolysaccharide and Interferon- γ Requires Nuclear Factor- κ B and Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 1. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 41624–41630, doi:10.1074/jbc.M207852200.
700. Crowley, S.M.; Han, X.; Allaire, J.M.; Stahl, M.; Rauch, I.; Knodler, L.A.; Vallance, B.A. Intestinal Restriction of Salmonella Typhimurium Requires Caspase-1 and Caspase-11 Epithelial Intrinsic Inflammasomes. *PLoS Pathog* **2020**, *16*, e1008498, doi:10.1371/journal.ppat.1008498.
701. Thygesen, S.J.; Stacey, K.J. IRF 1 and IRF 2 Regulate the Non-canonical Inflammasome. *EMBO Rep* **2019**, *20*, doi:10.15252/embr.201948891.
702. Kim, Y.M.; Kang, H.S.; Paik, S.G.; Pyun, K.H.; Anderson, K.L.; Torbett, B.E.; Choi, I. Roles of IFN Consensus Sequence Binding Protein and PU.1 in Regulating IL-18 Gene Expression. *J Immunol* **1999**, *163*, 2000–2007.
703. Verweyen, E.; Holzinger, D.; Weinlage, T.; Hinze, C.; Wittkowski, H.; Pickkers, P.; Albeituni, S.; Verbist, K.; Nichols, K.E.; Schulert, G.; et al. Synergistic Signaling of TLR and IFN α/β Facilitates Escape of IL-18 Expression from Endotoxin Tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* **2020**, *201*, 526–539, doi:10.1164/rccm.201903-0659OC.
704. Zhu, Q.; Kanneganti, T.-D. Cutting Edge: Distinct Regulatory Mechanisms Control Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1 β . *J.I.* **2017**, *198*, 4210–4215, doi:10.4049/jimmunol.1700352.
705. Zhang, Y.; Saccani, S.; Shin, H.; Nikolajczyk, B.S. Dynamic Protein Associations Define Two Phases of IL-1 β Transcriptional Activation. *J Immunol* **2008**, *181*, 503–512, doi:10.4049/jimmunol.181.1.503.
706. Shirakawa, F.; Saito, K.; Bonagura, C.A.; Galson, D.L.; Fenton, M.J.; Webb, A.C.; Auron, P.E. The Human Prointerleukin 1 Beta Gene Requires DNA Sequences Both Proximal and Distal to the Transcription Start Site for Tissue-Specific Induction. *Mol Cell Biol* **1993**, *13*, 1332–1344, doi:10.1128/mcb.13.3.1332-1344.1993.

707. Adamik, J.; Wang, K.Z.Q.; Unlu, S.; Su, A.-J.A.; Tannahill, G.M.; Galson, D.L.; O'Neill, L.A.; Auron, P.E. Distinct Mechanisms for Induction and Tolerance Regulate the Immediate Early Genes Encoding Interleukin 1 β and Tumor Necrosis Factor α . *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70622, doi:10.1371/journal.pone.0070622.
708. Hiscott, J.; Marois, J.; Garoufalos, J.; D'Addario, M.; Roulston, A.; Kwan, I.; Pepin, N.; Lacoste, J.; Nguyen, H.; Bensi, G. Characterization of a Functional NF-Kappa B Site in the Human Interleukin 1 Beta Promoter: Evidence for a Positive Autoregulatory Loop. *Mol Cell Biol* **1993**, *13*, 6231–6240, doi:10.1128/mcb.13.10.6231-6240.1993.
709. Guarda, G.; Braun, M.; Staehli, F.; Tardivel, A.; Mattmann, C.; Förster, I.; Farlik, M.; Decker, T.; Du Pasquier, R.A.; Romero, P.; et al. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity* **2011**, *34*, 213–223, doi:10.1016/j.immuni.2011.02.006.
710. Griffith, B.G.C.; Upstill-Goddard, R.; Brunton, H.; Grimes, G.R.; Biankin, A.V.; Serrels, B.; Byron, A.; Frame, M.C. FAK Regulates IL-33 Expression by Controlling Chromatin Accessibility at c-Jun Motifs. *Sci Rep* **2021**, *11*, 229, doi:10.1038/s41598-020-80111-9.
711. Ali, S.; Mohs, A.; Thomas, M.; Klare, J.; Ross, R.; Schmitz, M.L.; Martin, M.U. The Dual Function Cytokine IL-33 Interacts with the Transcription Factor NF-KB To Dampen NF-KB–Stimulated Gene Transcription. *J.I.* **2011**, *187*, 1609–1616, doi:10.4049/jimmunol.1003080.
712. Choi, Y.-S.; Park, J.A.; Kim, J.; Rho, S.-S.; Park, H.; Kim, Y.-M.; Kwon, Y.-G. Nuclear IL-33 Is a Transcriptional Regulator of NF-KB P65 and Induces Endothelial Cell Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *421*, 305–311, doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.005.
713. Karki, R.; Kanneganti, T.-D. Diverging Inflammasome Signals in Tumorigenesis and Potential Targeting. *Nat Rev Cancer* **2019**, *19*, 197–214, doi:10.1038/s41568-019-0123-y.
714. Cheneval, D.; Ramage, P.; Kastelic, T.; Szelestenyi, T.; Niggli, H.; Hemmig, R.; Bachmann, M.; MacKenzie, A. Increased Mature Interleukin-1 β (IL-1 β) Secretion from THP-1 Cells Induced by Nigericin Is a Result of Activation of P45 IL-1 β -Converting Enzyme Processing. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 17846–17851, doi:10.1074/jbc.273.28.17846.
715. Perregaux, D.; Gabel, C.A. Interleukin-1 Beta Maturation and Release in Response to ATP and Nigericin. Evidence That Potassium Depletion Mediated by These Agents Is a Necessary and Common Feature of Their Activity. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 15195–15203.
716. Lin, Y.; Devin, A.; Rodriguez, Y.; Liu, Z. -g. Cleavage of the Death Domain Kinase RIP by Caspase-8 Prompts TNF-Induced Apoptosis. *Genes & Development* **1999**, *13*, 2514–2526, doi:10.1101/gad.13.19.2514.
717. Zhang, L.; Blackwell, K.; Workman, L.M.; Chen, S.; Pope, M.R.; Janz, S.; Habelhah, H. RIP1 Cleavage in the Kinase Domain Regulates TRAIL-Induced NF-KB Activation and Lymphoma Survival. *Mol Cell Biol* **2015**, *35*, 3324–3338, doi:10.1128/MCB.00692-15.
718. Sandstrom, A.; Mitchell, P.S.; Goers, L.; Mu, E.W.; Lesser, C.F.; Vance, R.E. Functional Degradation: A Mechanism of NLRP1 Inflammasome Activation by Diverse Pathogen Enzymes. *Science* **2019**, *364*, eaau1330, doi:10.1126/science.aau1330.
719. Xu, H.; Shi, J.; Gao, H.; Liu, Y.; Yang, Z.; Shao, F.; Dong, N. The N-end Rule Ubiquitin Ligase UBR2 Mediates NLRP1B Inflammasome Activation by Anthrax Lethal Toxin. *EMBO J* **2019**, *38*, doi:10.15252/embj.2019101996.
720. Gewirtz, A.T.; Navas, T.A.; Lyons, S.; Godowski, P.J.; Madara, J.L. Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J Immunol* **2001**, *167*, 1882–1885, doi:10.4049/jimmunol.167.4.1882.
721. Lamkanfi, M.; Dixit, V.M. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2012**, *28*, 137–161, doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155745.
722. Abdelaziz, D.H.; Amr, K.; Amer, A.O. Nlrc4/Ipaf/CLAN/CARD12: More than a Flagellin Sensor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2010**, *42*, 789–791, doi:10.1016/j.biocel.2010.01.003.
723. Broz, P.; Newton, K.; Lamkanfi, M.; Mariathasan, S.; Dixit, V.M.; Monack, D.M. Redundant Roles for Inflammasome Receptors NLRP3 and NLRC4 in Host Defense against Salmonella. *Journal of Experimental Medicine* **2010**, *207*, 1745–1755, doi:10.1084/jem.20100257.
724. Eaves-Pyles, T.; Bu, H.-F.; Tan, X.; Cong, Y.; Patel, J.; Davey, R.A.; Strasser, J.E. Luminal-Applied Flagellin Is Internalized by Polarized Intestinal Epithelial Cells and Elicits Immune

- Responses via the TLR5 Dependent Mechanism. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24869, doi:10.1371/journal.pone.0024869.
725. Zipfel, C.; Robatzek, S.; Navarro, L.; Oakeley, E.J.; Jones, J.D.G.; Felix, G.; Boller, T. Bacterial Disease Resistance in Arabidopsis through Flagellin Perception. *Nature* **2004**, *428*, 764–767, doi:10.1038/nature02485.
726. Jelenska, J.; Davern, S.M.; Standaert, R.F.; Mirzadeh, S.; Greenberg, J.T. Flagellin Peptide Flg22 Gains Access to Long-Distance Trafficking in Arabidopsis via Its Receptor, FLS2. *Journal of Experimental Botany* **2017**, *68*, 1769–1783, doi:10.1093/jxb/erx060.
727. Eaves-Pyles, T.D.; Wong, H.R.; Odoms, K.; Pyles, R.B. *Salmonella* Flagellin-Dependent Proinflammatory Responses Are Localized to the Conserved Amino and Carboxyl Regions of the Protein. *J Immunol* **2001**, *167*, 7009–7016, doi:10.4049/jimmunol.167.12.7009.
728. Smith, K.D.; Andersen-Nissen, E.; Hayashi, F.; Strobe, K.; Bergman, M.A.; Barrett, S.L.R.; Cookson, B.T.; Aderem, A. Toll-like Receptor 5 Recognizes a Conserved Site on Flagellin Required for Protofilament Formation and Bacterial Motility. *Nat Immunol* **2003**, *4*, 1247–1253, doi:10.1038/ni1011.
729. Yang, J.; Zhao, Y.; Li, P.; Yang, Y.; Zhang, E.; Zhong, M.; Li, Y.; Zhou, D.; Cao, Y.; Lu, M.; et al. Sequence Determinants of Specific Pattern-Recognition of Bacterial Ligands by the NAIP–NLRC4 Inflammasome. *Cell Discov* **2018**, *4*, 22, doi:10.1038/s41421-018-0018-1.
730. Makoni, N.J.; Nichols, M.R. The Intricate Biophysical Puzzle of Caspase-1 Activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2021**, *699*, 108753, doi:10.1016/j.abb.2021.108753.
731. Abdelaziz, D.H.; Amr, K.; Amer, A.O. Nlrc4/Ipaf/CLAN/CARD12: More than a Flagellin Sensor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2010**, *42*, 789–791, doi:10.1016/j.biocel.2010.01.003.
732. Ruan, J.; Xia, S.; Liu, X.; Lieberman, J.; Wu, H. Cryo-EM Structure of the Gasdermin A3 Membrane Pore. *Nature* **2018**, *557*, 62–67, doi:10.1038/s41586-018-0058-6.
733. Aachoui, Y.; Kajiwara, Y.; Leaf, I.A.; Mao, D.; Ting, J.P.-Y.; Coers, J.; Aderem, A.; Buxbaum, J.D.; Miao, E.A. Canonical Inflammasomes Drive IFN- γ to Prime Caspase-11 in Defense against a Cytosol-Invasive Bacterium. *Cell Host & Microbe* **2015**, *18*, 320–332, doi:10.1016/j.chom.2015.07.016.
734. Heinz, S.; Romanoski, C.E.; Benner, C.; Glass, C.K. The Selection and Function of Cell Type-Specific Enhancers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2015**, *16*, 144–154, doi:10.1038/nrm3949.
735. McConnell, B.B.; Vertino, P.M. TMS1/ASC: The Cancer Connection. *Apoptosis* **2004**, *9*, 5–18, doi:10.1023/B:APPT.0000012117.32430.0c.
736. Bouchier-Hayes, L.; Martin, S.J. CARD Games in Apoptosis and Immunity. *EMBO Rep* **2002**, *3*, 616–621, doi:10.1093/embo-reports/kvf139.
737. Yoo, L.; Hong, S.; Shin, K.S.; Kang, S.J. PARP-1 Regulates the Expression of Caspase-11. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2011**, *408*, 489–493, doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.070.
738. Kajiwara, Y.; Schiff, T.; Voloudakis, G.; Gama Sosa, M.A.; Elder, G.; Bozdagi, O.; Buxbaum, J.D. A Critical Role for Human Caspase-4 in Endotoxin Sensitivity. *J.I.* **2014**, *193*, 335–343, doi:10.4049/jimmunol.1303424.

Titre : Rôle des flagelles dans la réponse inflammatoire au cours de l'infection par *Clostridioides difficile*.

Mots clés : *Clostridioides difficile* ; flagelline ; inflammasome ; NLRC4 ; pro-caspase-1 ; gasdermin ; IL-1 β ; IL-18 ; IL-33

Résumé : *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) est une cause majeure de diarrhée et de colites nosocomiales. Les infections à *C. difficile* (ICD) induisent une inflammation intestinale importante avec un taux de mortalité élevé. Les flagelles de *C. difficile* pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse en contribuant à la réponse inflammatoire de l'hôte et aux lésions de la muqueuse. En effet, la flagelline FliC de *C. difficile* interagit avec le récepteur de la réponse immunitaire innée TLR5 pour activer les voies de signalisation pro-inflammatoires de NF- κ B et des MAPKs. Les flagelles des agents pathogènes intracellulaires peuvent activer la voie de l'inflammasome de la protéine 4 contenant le domaine CARD de la famille NLR (NLRC4). Notre objectif était d'étudier le rôle potentiel des flagelles de *C. difficile* sur l'activation de l'inflammasome NLRC4 *in vitro*. Nous avons montré que FliC de

C. difficile, bactérie extracellulaire, est internalisée dans les cellules épithéliales et active l'inflammasome NLRC4. La microscopie confocale a montré l'internalisation de la GFP-FliC recombinante dans la lignée cellulaire intestinale et sa colocalisation avec NLRC4 et la pro-caspase-1. De plus, FliC active l'inflammasome caspase-1/NLRC4 et induit le clivage de la pro-caspase-1 en deux sous-unités, p20 et p10, l'activation de la gasdermine D (GSDMD), une surexpression des gènes pro-inflammatoires liés à l'inflammasome (interleukine (IL)-1 β , IL-18 et IL-33), et la synthèse de l'IL-18. En outre, nous avons démontré un rôle d'I-kappa-B kinase alpha (IKK- α) sur l'expression des gènes d'interleukines liés à l'inflammasome dépendant de FliC. Ces résultats mettent en évidence le rôle des flagelles de *C. difficile* dans l'induction d'une réponse inflammatoire intestinale, via la voie de l'inflammasome NLRC4.

Title: Role of flagella in the inflammatory response during *Clostridioides difficile* infection.

Keywords : *Clostridioides difficile*; flagellin; inflammasome; NLRC4; pro-caspase-1; gasdermin; IL-1 β ; IL-18; IL-33

Abstract : *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) is a major cause of nosocomial diarrhea and colitis. *C. difficile* infections (CDI) induce significant intestinal inflammation with a high mortality rate. *C. difficile* flagella may play a role in pathogenesis by contributing to the host inflammatory response and mucosal damage. Indeed, the *C. difficile* flagellin FliC interacts with the innate immune response receptor TLR5 to activate pro-inflammatory NF- κ B and MAPKs signaling pathways. Flagella from intracellular pathogens can activate the NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) inflammasome pathway. Our objective was to investigate the potential role of *C. difficile* flagella on NLRC4 inflammasome activation *in vitro*. We showed that FliC of *C. difficile*, an extracellular bacterium, is internalized in epithelial

cells and activates the NLRC4 inflammasome. Confocal microscopy showed the internalization of recombinant GFP-FliC into the intestinal cell line and its colocalization with NLRC4 and pro-caspase-1. Furthermore, FliC activates the caspase-1/NLRC4 inflammasome and induces cleavage of pro-caspase-1 into two subunits, p20 and p10, activation of gasdermin D (GSDMD), overexpression of inflammasome-related pro-inflammatory genes (interleukin (IL)-1 β , IL-18, and IL-33), and IL-18 synthesis. In addition, we demonstrated a role for I-kappa-B kinase alpha (IKK- α) on FliC-dependent inflammasome-related interleukin gene expression. These results highlight the role of *C. difficile* flagella in inducing an intestinal inflammatory response via the NLRC4 inflammasome pathway.