



Université de Montréal

**Étude sur le biofilm et les mécanismes de résistance à la  
bacitracine chez *Clostridium perfringens***

**Par**

**Audrey Charlebois**

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de  
philosophiae doctor (**Ph.D.**)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Janvier 2015

© Audrey Charlebois, 2015

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**Étude sur le biofilm et les mécanismes de résistance à la  
bacitracine chez *Clostridium perfringens***

présentée par  
Audrey Charlebois

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Daniel Dubreuil, président-rapporteur  
Dre Marie Archambault, directrice de recherche  
Dr Mario Jacques, codirecteur  
Dre Ann Letellier, membre du jury  
Dr Martin Chénier, examinateur externe

## **RÉSUMÉ**

*Clostridium perfringens* est ubiquitaire dans l'environnement. Ce microorganisme peut être retrouvé dans la flore normale du tractus gastro-intestinal des mammifères et peut également causer une variété d'infections intestinales. Le phénotype de résistance à la bacitracine a déjà été rapporté chez *C. perfringens* mais les gènes associés n'ont pas été caractérisés. Dans cette étude, 24 des 99 isolats de *C. perfringens* aviaires testés ont démontré une résistance à la bacitracine. Les analyses ont révélé la présence d'un transporteur ABC ainsi que d'une undécaprénol kinase surproduite. Ces deux mécanismes semblent être codés par l'opéron *bcrABDR*. En amont et en aval des gènes *bcr*, un élément IS1216-like a été identifié, celui-ci pouvant jouer un rôle dans la dissémination de la résistance à la bacitracine. Des analyses d'hybridation sur ADN ont révélé que les gènes *bcrABDR* étaient localisés sur le chromosome. De plus, il a été démontré que les gènes *bcr* étaient exprimés en présence de bacitracine.

Plusieurs études ont associé la tolérance aux antibiotiques et aux désinfectants à la formation de biofilm. Dans la littérature, peu d'informations sont disponibles sur le biofilm de *C. perfringens*. La majorité des isolats testés dans cette étude ont démontré la formation d'un biofilm. L'analyse de la matrice a démontré que celle-ci contenait des protéines, de l'ADN extracellulaire ainsi que des polysaccharides liés en bêta-1,4. Une meilleure survie des cellules en biofilm a été observée suite à une exposition à de fortes concentrations d'antibiotiques. Une exposition à de faibles doses de certains antibiotiques semblait diminuer le biofilm formé alors que pour d'autres, le biofilm semblait augmenter. Dans la présente étude, la susceptibilité des biofilms de *C. perfringens* à la désinfection a été également analysée. Les résultats ont démontré que la formation de biofilm protégeait les cellules de l'action du monopersulfate de potassium, des ammoniums quaternaires, du peroxyde d'hydrogène et du glutéraldéhyde. Toutefois, l'hypochlorite de sodium a été démontré comme étant efficace contre le biofilm de *C. perfringens*. Il a été démontré que les biofilms mixtes de *C. perfringens* cultivés en présence de *Staphylococcus aureus* ou d'*Escherichia coli* étaient plus résistants à la désinfection en comparaison aux biofilms simples de *S. aureus* ou d'*E. coli*. Toutefois, le biofilm simple de *C. perfringens* était plus résistant à la désinfection que les biofilms mixtes.

Finalement, les profils de transcription entre les populations planctoniques et en biofilm ont été analysés par séquençage d'ARN. L'analyse transcriptomique du biofilm a identifié 238 gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions. Les gènes négativement régulés sont impliqués dans la virulence, la production d'énergie, le métabolisme des sucres ainsi que dans la biosynthèse des acides gras et des acides aminés alors que les gènes induits sont impliqués dans la réponse au stress et au stress oxydatif, dans la biosynthèse d'acides gras et de phospholipides ainsi que dans la virulence.

Cette étude décrit pour la première fois la découverte des gènes associés à la résistance à la bacitracine chez *C. perfringens*. Elle rapporte également de nouvelles données sur la matrice du biofilm, la tolérance aux antibiotiques et aux désinfectants ainsi que sur le transcriptome du biofilm de *C. perfringens*.

Mots clés: *Clostridium perfringens*, résistance à la bacitracine, formation de biofilm, transcriptome

## **SUMMARY**

*Clostridium perfringens* is ubiquitous in the environment. This microorganism can be found in the intestinal tract of mammals as normal flora and can also cause many gastrointestinal infections. Phenotypic bacitracin resistance has been reported in the literature for *C. perfringens* but the genes responsible for this resistance have not yet been characterized. In this study, twenty-four of the 99 poultry isolates tested showed bacitracin resistance. Analysis revealed putative genes encoding for both an ABC transporter and an overproduced undecaprenol kinase. These two mechanisms were shown to be both encoded by the putative *bcrABDR* operon. An IS1216-like element was found upstream and downstream from the *bcr* cluster, which may play a role in the dissemination of this resistance determinant. DNA hybridization analyses revealed that the bacitracin resistance genes *bcrABDR* were located on the chromosome. Moreover, this gene cluster has been shown to be expressed under bacitracin stress.

Many studies have associated tolerance to antibiotics and disinfectants to biofilm. In the literature, very little is known on the biofilm formation by *C. perfringens*. Most of the *C. perfringens* isolates tested in this study were able to form biofilms. Matrix composition analysis revealed the presence of proteins, extracellular DNA and beta-1,4 linked polysaccharides. Biofilm could also protect *C. perfringens* bacterial cells from an exposition to high concentrations of antibiotics. Exposition to low doses of antibiotics tended to lead to a diminution of the biofilm formed but for few isolates, the biofilm formation was increased. In the present study, susceptibilities of *C. perfringens* biofilms to disinfectants were also analysed. Results showed that biofilms can protect the bacterial cells from the action of potassium monopersulfate, quaternary ammonium chlorides, hydrogen peroxide and gluteraldehyde solutions. However, sodium hypochlorite solution was shown to be effective on *C. perfringens* biofilms. Our investigation of dual-species biofilms of *C. perfringens* with the addition of *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* demonstrated that these dual-species biofilms were more tolerant to disinfection with sodium hypochlorite than the mono-species biofilms of *S. aureus* or *E. coli*. However, further disinfection studies using sodium hypochlorite suggest that the mono-species biofilms formed by *C. perfringens* is more tolerant to this disinfectant than the dual-species biofilms of *C. perfringens* with *S. aureus* or *E. coli*.



Finally, the differential gene expression patterns between planktonic populations and biofilms of *C. perfringens* were investigated by RNA sequencing. The transcriptomic analysis identified 238 genes that were significantly differentially expressed between both conditions. Genes that were down-regulated in biofilm cells, relative to planktonic cells, included those involved in virulence, energy production, carbohydrate metabolism, fatty acids and amino acids biosynthesis. On the other hand, genes up-regulated in biofilm cells were involved in oxidative and stress responses, fatty acids and phospholipids biosynthesis and few genes were involved in virulence.

This study reports on the discovery of genes associated to bacitracin resistance of *C. perfringens*. Our work brings also new data on matrix cohesion of the biofilm, tolerance to antibiotics and disinfectants, and on the transcriptome of the biofilm of *C. perfringens*.

Keywords: *Clostridium perfringens*, bacitracin resistance, biofilm formation, transcriptome

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>i</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>xvi</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xix</b>
I. INTRODUCTION .....	1
II. RECENSION DES ÉCRITS.....	6
1. <i>Clostridium perfringens</i> .....	7
1.1 Caractéristiques du genre .....	7
1.2 Caractéristiques de l'espèce .....	7
1.3 Facteurs de virulence.....	9
1.3.1 Toxine alpha ( $\alpha$ ).....	9
1.3.2 Toxine bêta ( $\beta$ 1).....	10
1.3.3 Toxine epsilon ( $\epsilon$ ) .....	10
1.3.4 Toxine iota (i).....	11
1.3.5 Entérotoxine (CPE).....	12
1.3.6 Autres toxines .....	13
1.4 Infections.....	18
1.4.1 Humain.....	18
1.4.1.1 Gangrène gazeuse.....	19
1.4.1.2 Empoisonnement alimentaire.....	19
1.4.2 Poulet .....	20
1.4.2.1 Entérite nécrotique .....	20
1.4.3 Porc .....	22
1.4.3.1 Entérite due au type C.....	22
1.4.3.2 Entérite due au type A.....	23
1.4.3.3 Gangrène gazeuse (type A).....	23

1.5. Résistance aux antibiotiques .....	24
1.5.1 Résistances naturelles.....	24
1.5.2 Résistances acquises.....	25
1.5.2.1 Bacitracine.....	25
1.5.2.2 Virginiamycine.....	28
1.5.2.3 Tétracyclines .....	29
1.5.2.4 Macrolides et lincosamides .....	30
1.5.2.5 Chloramphénicol .....	31
1.5.2.6 $\beta$ -lactamines .....	31
2. Biofilm .....	32
2.1 Généralités.....	32
2.2 Modèle de formation.....	33
2.3 Composition de la matrice .....	36
2.3.1 Exopolysaccharides.....	36
2.3.2 Protéines.....	36
2.3.3 ADN extracellulaire .....	39
2.3.4 Autres composants .....	40
2.4 Tolérance aux antibiotiques et aux désinfectants.....	40
2.5 Exposition à des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques.....	41
2.6 <i>C. perfringens</i> .....	42
3. Analyse du transcriptome.....	44
3.1 Généralités.....	44
3.2 Étude de l'expression des gènes.....	44
3.2.1 Séquençage de l'ARN .....	44
3.2.2 Puce à ADN.....	46
3.2.3 PCR quantitatif en temps réel .....	48
3.3 Étude du biofilm.....	48
4. Problématique, hypothèses et objectifs .....	50
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS .....	53
<u>Article 1</u>	
“Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in <i>Clostridium perfringens</i> ” .....	54

<u>Article 2</u>	
“Biofilm formation of <i>Clostridium perfringens</i> and its exposure to low-dose antimicrobials” .....	88
<u>Article 3</u>	
“Tolerance of <i>Clostridium perfringens</i> biofilms to disinfectants commonly used in farms and food processing environments” .....	123
<u>Article 4</u>	
“Comparative transcriptomic analysis of <i>Clostridium perfringens</i> biofilm and planktonic cells” .....	150
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE .....	193
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	209
VI. SOURCES DOCUMENTAIRES.....	213
<b>ANNEXE .....</b>	<b>xxi</b>
“Characterization of hospital-associated lineages of ampicillin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> from clinical cases in dogs and humans” .....	xxii

## LISTE DES TABLEAUX

### Recension des écrits

**Tableau I.** Classification de *C. perfringens* selon les toxines produites.....9

**Tableau II.** Toxines décrites chez *C. perfringens*.....13

### Article 1

**Table 1.** MICs and percentages of bacitracin resistance of *C. perfringens* isolates.....80

**Table 2.** Bacitracin MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of *C. perfringens* strain c1261\_A grown with different concentrations of efflux pump inhibitors.....81

**Table S1.** Primers for sequencing novel bacitracin resistant genes of *C. perfringens* strain c1261\_A using the primer walking method and new primer designs for PCR screening of *bcrA*, *bcrB*, *bcrD* and *bcrR*.....86

**Table S2.** New probe sequences added to the antimicrobial resistance microarray.....87

### Article 2

**Table 1.** *C. perfringens* selected isolates and their MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) to the antibiotics and anticoccidials tested in this study.....114

**Table 2.** Viability (%) of *C. perfringens* strain ATCC 13124 in biofilm after 24 h incubation with antibiotics and anticoccidials alone or in combinations.....115

**Table 3.** Effect of subinhibitory concentrations of bacitracin on biofilm formation as analysed by scanning laser confocal microscopy.....116

### Article 3

<b>Table 1.</b> Bacterial isolates used in this study.....	142
--	-----

### Article 4

<b>Table 1.</b> Primers used for validation of RNA sequencing results with qRT-PCR.....	172
---	-----

<b>Table 2.</b> Genes up-regulated in <i>C. perfringens</i> biofilms compared to planktonic cells from a biofilm.....	175
---	-----

<b>Table 3.</b> Genes down-regulated in <i>C. perfringens</i> biofilms compared to planktonic cells from a biofilm.....	179
---	-----

<b>Table S1.</b> Genes up-regulated in <i>C. perfringens</i> biofilms compared to planktonic cells from a stationary phase culture.....	186
---	-----

<b>Table S2.</b> Genes down-regulated in <i>C. perfringens</i> biofilms compared to planktonic cells from a stationary phase culture .....	188
--	-----

<b>Table S3.</b> Genes up-regulated in <i>C. perfringens</i> planktonic cells from the supernatant of the biofilm compared to planktonic cells.....	191
---	-----

<b>Table S4.</b> Genes down-regulated in <i>C. perfringens</i> planktonic cells from the supernatant of the biofilm compared to planktonic cells.....	192
---	-----

### Annexe 1

<b>Table 1.</b> Characterization of <i>E. faecium</i> isolates from human and canine enterococcal infections.....	xlvi
---	------

<b>Table 2.</b> Primers and conditions used in PCR for confirmation of microarray results and for <i>rep</i> -like genes identification.....	xlvii
--	-------

**Table 3.** Antibiotic resistance of *E. faecium* clinical isolates from humans and dogs based on MICs.....xlix

**Table 4.** Mutations in *gyrA/B* and *parC* of clinical *E. faecium* isolates with their corresponding ciprofloxacin MIC.....1

**Table 5.** Amino acid changes detected in the C- and N-terminal regions of *pbp5* of clinical *E. faecium* isolates.....li

## LISTE DES FIGURES

### Recension des écrits

<b>Figure 1.</b> Mécanisme d'action de la bacitracine.....	26
<b>Figure 2.</b> Modèle de formation du biofilm.....	35
<b>Figure 3.</b> Préparation d'une librairie pour le séquençage de l'ARN.....	45
<b>Figure 4.</b> Analyse transcriptionnelle par puce à ADN.....	47

### Article 1

<b>Figure 1.</b> Comparison between the <i>C. perfringens</i> <i>bcrABDR</i> genes, the <i>E. faecalis</i> <i>bcrABD</i> operon and the <i>B. licheniformis</i> <i>bcrABC</i> operon.....	82
<b>Figure 2.</b> Expression and cotranscription of <i>bcrABDR</i> genes in presence of bacitracin.....	83
<b>Figure 3.</b> PFGE and hybridization analysis of I-CeuI and MluI double-digested DNA of the bacitracin resistant <i>C. perfringens</i> strain c1261_A.....	84
<b>Figure S1.</b> Dendrogram of the MLVA types of <i>C. perfringens</i> resistant isolates.....	85

### Article 2

<b>Figure 1.</b> Biofilm formation by <i>C. perfringens</i> isolates.....	117
<b>Figure 2.</b> Viability of planktonic cells compared to cells in biofilm following exposure to oxygen and antimicrobials.....	118
<b>Figure 3.</b> Effect of low-dose antimicrobials on biofilm formation.....	119



**Figure 4.** Biofilm morphologies observed by scanning laser confocal microscopy.....120

**Figure 5.** Matrix composition of *C. perfringens* biofilm.....121

**Figure 6.** Effect of enzymatic treatments on pre-formed *C. perfringens* biofilm.....122

### Article 3

**Figure 1.** Viability of *C. perfringens* ATCC 13124 planktonic cells compared to cells in biofilm following exposure to disinfectants.....144

**Figure 2.** Viability of *C. perfringens* isolates of clinical and commensal origins in biofilm following exposure to disinfectants.....145

**Figure 3:** Differences in survival between none, weak, moderate or high biofilm producers following exposure to disinfectants.....146

**Figure 4.** Percentages of total viability mean of mono-species biofilms grown in aerobic conditions compared to dual-species biofilms following exposure to disinfectants.....147

**Figure 5:** Percentages of total viability mean of mono-species biofilms grown in anaerobic conditions compared to dual-species biofilms following exposure to disinfectants.....149

### Article 4

**Figure 1.** Functional classification of genes differentially expressed in biofilm.....174

**Figure 2.** Gene expression under planktonic, planktonic biofilm and biofilm growth conditions.....184

**Figure 3.** Validation of transcriptomic results of RNA sequencing by qRT-PCR.....185

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AAD	<i>Antibiotic-associated diarrhea</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN ( <i>DNA</i> )	Acide désoxyribonucléique ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
ADNe	Acide désoxyribonucléique extracellulaire
ADP	Adénosine di-phosphate
ARE	<i>Ampicillin-resistant Enterococcus faecium</i>
ARN ( <i>RNA</i> )	Acide ribonucléique ( <i>Ribonucleic acid</i> )
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ARNr ( <i>rRNA</i> )	Acide ribonucléique ribosomal ( <i>Ribosomal ribonucleic acid</i> )
ATP	Adénosine tri-phosphate
Bap	<i>Biofilm-associated protein</i>
BHI	<i>Brain hearth infusion medium</i>
BLASTN	<i>Nucleotide basic local alignment search tool</i>
BLASTP	<i>Protein basic local alignment search tool</i>
CC	<i>Clonal complex</i>
CcpA	<i>Catabolite control protein</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CFIA	<i>Canadian Food Inspection Agency</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
CHEF	<i>Contour-clamped homogeneous electric field</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI ( <i>MIC</i> )	Concentration minimale inhibitrice ( <i>Minimal inhibitory concentration</i> )
CMM	<i>Cooked meat medium</i>
CPA/PLC	<i>Clostridium perfringens alpha toxin</i>
CPB2	<i>Clostridium perfringens beta 2 toxin</i>
CPE	<i>Clostridium perfringens enterotoxin</i>
CPS	Culture planctonique en phase stationnaire
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTP	Cytosine triphosphate
dNTP	Désoxynucléotides tri-phosphate

DO (OD)	Densité optique ( <i>Optical density</i> )
EPS	Exopolysaccharides
FDR	False discovery rate
FTG	<i>Fluid thioglycolate medium</i>
GTP	Guanine triphosphate
HA <i>E. faecium</i>	<i>Hospital-associated E. faecium</i>
IS	<i>Insertion sequence</i>
Kb	Kilobase
MATE	<i>Multiple antimicrobial and toxin extrusion</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MLS <sub>B</sub>	Macrolide-Lincosamides-Streptogramines B
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MIC <sub>50</sub>	<i>Minimal inhibitory concentration for 50% of the isolates</i>
MIC <sub>90</sub>	<i>Minimal inhibitory concentration for 90% of the isolates</i>
MLVA	<i>Multiple loci variable number of tandem repeats analysis</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
NELoc	<i>Necrotic enteritis-associated loci</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
Pb (bp)	Paire de base ( <i>base pair</i> )
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEA	Alcool phényléthylique
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PFO	Perfringolysine O
PGA/PNAG	Poly β-1, 6-N-acétylglucosamine
QRDR	<i>Quinolone resistance-determining regions</i>
RPKM	Reads per kilobase of coding sequence per million mapped reads
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase- polymerase chain reaction</i>
SB	Cellules du surnageant du biofilm

SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFP	<i>Shahidi-Ferguson-Perfringens agar</i>
SMR	<i>Small multi-drug resistance</i>
Sous-CMI ( <i>sub-MIC</i> )	<i>Concentration sous- inhibitrice (subinhibitory concentration)</i>
Sp.	<i>Species</i>
ST	<i>Sequence type</i>
STEC	<i>Shiga toxin-producing Escherichia coli</i>
TFP	<i>Type four (IV) pili</i>
TPG	<i>Trypticase-peptone-glucose medium</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth medium</i>
UP	<i>Undécaprényl phosphate</i>
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
UPP	<i>Undécaprényl pyrophosphate</i>
UTP	<i>Uracil triphosphate</i>
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
VRE	<i>Vancomycin-resistant enterococci</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
XRE	<i>Xenobiotic response element</i>

## REMERCIEMENTS

Merci à ma directrice de recherche, la Dre Marie Archambault, pour m'avoir donné la possibilité de travailler dans son laboratoire, de m'avoir encouragé à continuer et de m'avoir toujours soutenue. Merci également de m'avoir permis de présenter mes résultats de recherche à divers congrès scientifiques.

Merci à mon co-directeur, Dr Mario Jacques, pour sa supervision, sa disponibilité et ses conseils.

Merci aux membres du laboratoire, Cindy-Love Tremblay, Louis-Alexandre Jalbert, Michael Beaudry-Ferland, Carl F. Uhland, Geneviève Pelletier-Jacques, Edisleidy Rodriguez-Batista, François-Nicholas Proulx, Jocelyn Bernier-Lachance, Eric Parent, Valentine Usongo, Josée Labrie et Claudia Duquette pour votre aide, vos conseils et votre amitié.

Merci aux Drs John F. Prescott et Valeria Parreira Pinto, de l'Université de Guelph, ainsi qu'aux Drs Dion Lepp et Joshua Gong, d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, pour leur collaboration et leur aide précieuse.

Merci aux membres de mon comité conseil, Dre Josée Harel et Dr Charles Dozois, ainsi qu'aux membres du jury d'évaluation de cette thèse.

Merci au personnel des laboratoires de virologie et de bactériologie de la Faculté de médecine vétérinaire pour leur aide.

Merci à tous les membres, étudiants et le personnel du GREMIP et du CRIPA pour leur aide et leurs suggestions.

Merci à Guy Beauchamp pour son aide avec les statistiques et à Frédéric Berthiaume pour son aide avec la microscopie confocale.

Merci au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) ainsi qu'au Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) pour leur contribution financière.

Et, finalement, un merci spécial à ma famille et à mes amis pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mon doctorat.

## **I. INTRODUCTION**



*Clostridium perfringens* est une bactérie anaérobie à Gram positif pouvant former des spores. Elle est impliquée dans un large éventail d'infections tant chez l'humain que chez les animaux. Les souches de *C. perfringens* sont classées en cinq toxinotypes (A à E) dépendamment de la production de quatre toxines majeures, soit alpha, bêta, epsilon et iota <sup>[1]</sup>. Ce microorganisme est une bactérie commensale du tractus gastro-intestinal des mammifères mais il peut également être retrouvé dans le sol et dans l'eau <sup>[2]</sup>. *C. perfringens* est responsable, chez l'humain, de la gangrène gazeuse, de l'entérite nécrotique, d'empoisonnements alimentaires et d'autres infections gastro-intestinales non reliées à l'alimentation dont la diarrhée associée à l'utilisation d'antibiotiques <sup>[3]</sup>. *C. perfringens* est également impliqué dans une variété d'infections intestinales chez plusieurs espèces animales <sup>[4]</sup>. Les isolats provenant d'animaux peuvent être transmis aux humains via la chaîne alimentaire et peuvent donc constituer un risque de zoonose. Cette bactérie a une importance particulière pour l'industrie de la volaille, où elle peut causer des cas d'entérite nécrotique coûtant à l'industrie aviaire mondiale plus de 2 milliards de dollars américains par année <sup>[5,6]</sup>.

Les cas d'entérites nécrotiques sont normalement contrôlés par l'addition de bacitracine dans la nourriture des oiseaux. La bacitracine est un antibiotique de type polypeptide synthétisé par *Bacillus licheniformis* et par quelques souches de *Bacillus subtilis*. Cet antimicrobien inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne en se liant étroitement à l'undécaprényl pyrophosphate (UPP), prévenant ainsi la récupération de l'undécaprényl monophosphate. Ce dernier est le transporteur lipidique responsable de la translocation des monomères de peptidoglycane du cytosol au côté externe de la membrane cytoplasmique <sup>[7, 8]</sup>. Chez l'humain, la bacitracine est utilisée de façon topique mais non systémique, car elle est néphrotoxique <sup>[9]</sup>. Chez les animaux, cet antibiotique est largement utilisé en usage curatif et en prophylaxie. Même si son utilisation comme promoteur de croissance est bannie en Europe depuis 1999, la bacitracine est toujours utilisée comme supplément alimentaire dans certains pays comme le Canada, la Nouvelle-Zélande et les États-Unis <sup>[10-12]</sup>.

Jusqu'à présent, quatre mécanismes de résistance à la bacitracine ont été décrits. Le premier mécanisme, retrouvé chez *B. licheniformis*, est une pompe à efflux qui permet l'expulsion de l'antimicrobien hors de la cellule <sup>[13]</sup>. Il s'agit du mécanisme le plus souvent rencontré chez les bactéries résistantes à la bacitracine. La production d'une undécaprényl pyrophosphate (UPP) phosphatase est le deuxième mécanisme de résistance à la bacitracine. Cette enzyme, qui est excrétée à l'extérieur de la bactérie, va compétitionner avec la bacitracine pour la liaison à l'UPP. Suite à la liaison de l'UPP phosphatase à sa cible, il y a déphosphorylation du transporteur membranaire en undécaprényl phosphate (UP) puis récupération à l'intérieur de la bactérie <sup>[14]</sup>. Le troisième mécanisme de résistance à la bacitracine consiste en la synthèse *de novo* du transporteur UP, à partir de l'undécaprénol présent dans la membrane, par une undécaprénol kinase surexprimée <sup>[15]</sup>. Le dernier mécanisme implique les exopolysaccharides. Chez les bactéries à Gram négatif *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas* sp. et *Escherichia coli*, la résistance serait due à un arrêt de la production des exopolysaccharides. Comme les voies de biosynthèse des exopolysaccharides et du peptidoglycane utiliseraient le même transporteur, soit l'undécaprényl phosphate (UP), l'arrêt de la production des exopolysaccharides permettrait de détourner les transporteurs utilisés dans cette voie vers celle impliquée dans la production du peptidoglycane, permettant ainsi la synthèse de la paroi essentielle à la survie de la bactérie <sup>[16, 17]</sup>. Dans le cas de *Streptococcus mutans*, la production du polysaccharide rhamnose-glucose créerait une barrière qui empêcherait la bacitracine d'atteindre sa cible à la surface de la cellule <sup>[18]</sup>. Malgré le fait que plusieurs études ont démontré de la résistance à la bacitracine au niveau phénotypique chez *C. perfringens* <sup>[19-21]</sup>, les gènes responsables pour cette résistance n'ont pas encore été identifiés.

Un autre aspect qui pourrait influencer la résistance aux antibiotiques est la formation d'un biofilm. Le biofilm a été défini comme étant une communauté structurée de bactéries entourées d'une matrice de polymères, produite par ces mêmes bactéries, et adhérant à des surfaces inertes ou vivantes <sup>[22]</sup>. Cette structure permet aux bactéries de résister aux stress environnementaux <sup>[23, 24]</sup>. Toutefois, peu d'informations sont disponibles présentement sur le biofilm formé par *C. perfringens*. Varga *et al.* (2006) ont été les premiers à démontrer que cette bactérie pouvait

produire un biofilm <sup>[25]</sup>. Ils ont également démontré que la motilité dépendante du pilus de type IV ainsi que la protéine CcpA (catabolite control protein), un régulateur important dans la réponse de la bactérie suite à une carence en sucres, étaient nécessaires pour une formation maximale de biofilm par *C. perfringens*. Une des propriétés les plus importantes que possèdent les bactéries en biofilm est leur résistance accrue aux antibiotiques, aux stress environnementaux ainsi qu'aux désinfectants. Une fois le biofilm formé, les bactéries peuvent devenir de 10 à 10 000 fois moins susceptibles comparativement aux bactéries sous la forme planctonique <sup>[26]</sup>. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour cette tolérance, soit la diminution de l'entrée de l'antibiotique dans la matrice par des barrières chimiques ou physiques, une croissance ralentie due à une carence en nutriments au sein du biofilm, l'activation de la réponse aux stress des bactéries, l'émergence d'un phénotype spécifique au biofilm et la présence de phénotype dit persisteur <sup>[27]</sup>. Le biofilm de *C. perfringens* a été démontré comme étant de 5 à 15 fois plus résistant à la pénicilline G que les cellules planctoniques <sup>[25]</sup>. Au niveau phénotypique, Pettit *et al.* (2005) ont observé que les cellules de *Staphylococcus epidermidis* en biofilm étaient au moins 128 fois plus résistantes à la bacitracine alors que Zaidi *et al.* (2011) ont démontré que le biofilm de *Lactococcus lactis* était 10 fois plus résistant à la bacitracine que les cellules planctoniques <sup>[28, 29]</sup>. Toutefois, l'effet d'une exposition à de fortes concentrations de bacitracine, de virginiamycine, de lincomycine, de tylosine, d'ionophores ou de désinfectants sur la viabilité de *C. perfringens* en biofilm n'a pas encore été décrit. Ces antibiotiques sont largement utilisés chez le porc et la volaille dans certains pays en usage curatif, en prophylaxie ou comme promoteurs de croissance.

Dans la littérature, les données disponibles sur les effets de concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques sur la formation de biofilm sont contradictoires. Des études antérieures ont rapporté que la présence d'aminoglycosides et de  $\beta$ -lactames en concentrations sous-inhibitrices induirait la formation de biofilm <sup>[30, 31]</sup>. La cefotaxime, à 0.5 X la concentration minimale inhibitrice, induirait également la production de biofilm ainsi que la production d'exopolysaccharides chez trois isolats de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium <sup>[32]</sup>. Chez les *Staphylococcus aureus* possédant une résistance intermédiaire à la vancomycine, il a été démontré que des

doses sous-inhibitrices de vancomycine induisaient la formation de biofilm sur des surfaces en nylon et en silicone alors que l'oxacilline facilitait la formation de biofilm sur des surfaces en verre <sup>[33]</sup>. D'un autre côté, il a été observé que des concentrations de 0.03 et 0.06 fois la CMI diminuaient significativement l'adhésion et la formation de biofilm par *Stenotrophomonas maltophilia* <sup>[34]</sup>. Chez *S. epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus*, il a été démontré que les biofilms cultivés en présence de concentrations sous-inhibitrices de dicloxacilline avaient une densité cellulaire plus faible <sup>[35]</sup>. L'effet de l'exposition à des concentrations sous-inhibitrices de bacitracine, de virginiamycine, de lincomycine, de tylosine ou d'ionophores sur la formation de biofilm par *C. perfringens* n'a pas encore été décrit.

Récemment, les études transcriptomiques portant sur le biofilm permettent de mieux comprendre la génétique du biofilm et la régulation de certains groupes de gènes <sup>[36]</sup>. Ces travaux de génétique moléculaire des biofilms ont été facilités par l'utilisation de puces à ADN et, plus récemment, par le séquençage de l'ARN. Ces techniques permettent de détecter des différences dans l'expression des gènes entre différents phénotypes <sup>[37, 38]</sup>. Les analyses génétiques ont révélé que la formation de biofilm requérait l'expression d'un ensemble de gènes qui différaient de ceux exprimés chez les cellules planctoniques. Parmi ces gènes, ceux impliqués dans le chimiotaxisme, dans la motilité, dans la biosynthèse des exopolysaccharides et dans la réponse aux stress ont été identifiés <sup>[37, 39, 40]</sup>. Même s'il est connu que *C. perfringens* peut former du biofilm, les gènes différentiellement exprimés durant la formation de cette structure n'ont pas encore été déterminés.

Les objectifs de ce projet étaient de caractériser les éléments génétiques responsables de la résistance à la bacitracine chez *C. perfringens*, d'étudier la formation du biofilm et sa tolérance aux antibiotiques, puis d'analyser le transcriptome de *C. perfringens* en cultures planctoniques et en biofilm.

## **II. RECENSION DES ÉCRITS**

# ***1. Clostridium perfringens***

## **1.1 Caractéristiques du genre**

Les clostridies sont des bacilles à Gram positif anaérobies stricts ou, dans certains cas, aérotolérants. Quelques espèces peuvent croître en conditions aérobies mais elles ne peuvent pas sporuler<sup>[41]</sup>. Le genre comprend plus de 150 espèces et ces microorganismes ont une morphologie qui varie de courts bâtonnets coccoïdes à de longs filaments<sup>[42]</sup>. Elles sont majoritairement mobiles via l'utilisation de flagelles péritriches. *Clostridium* peut former des endospores déformantes rondes ou ovales qui sont résistantes à la chaleur, aux désinfectants et à la lumière ultraviolette<sup>[42, 43]</sup>. Ces bactéries peuvent métaboliser les sucres, les alcools, les acides aminés, les purines, les stéroïdes et autres substances organiques et certaines peuvent également fixer l'azote atmosphérique. Les clostridies sont souvent retrouvées dans la nature mais leurs habitats primaires sont le sol et le système digestif des animaux et des humains<sup>[41]</sup>.

## **1.2 Caractéristiques de l'espèce**

*Clostridium perfringens* a été isolé pour la première fois par Veillon et Zuber en 1898 et originellement appelé *Bacillus perfringens* (Veillon et Zuber, 1898, cité par Skerman *et al.*<sup>[44]</sup>). *C. perfringens* est un bâtonnet droit aux extrémités franches pouvant mesurer de 0.6 à 2.4 µm de largeur et 1.3 à 19 µm de longueur et pouvant être retrouvé seul ou en paire<sup>[41]</sup>. Son génome peut faire de 2897 kb à 3650 kb<sup>[3, 45]</sup>. Les spores de cette espèce sont rarement vues *in vivo* ou dans les conditions usuelles de croissance *in vitro*. Lorsqu'elles sont présentes, les spores sont larges et ovales, déformantes et situées en position centrale ou subterminale<sup>[41]</sup>. Cette bactérie utilise un mécanisme impliquant le pilus de type IV pour sa mobilité ("twitching")<sup>[25]</sup>. *C. perfringens* peut fermenter le glucose, le maltose, le lactose et le sucrose et peut produire de la lécithinase et du H<sub>2</sub>S<sup>[42]</sup>.

Environ 75 % des souches possèdent une capsule polysaccharidique composée, en proportions différentes, de glucose, de galactose, de mannose, d'acide glucuronique, de *N*-acétylgalactosamine et de *N*-acétylglucosamine<sup>[3, 46, 47]</sup>. La

présence de mannose et d'acide glucuronique dans la capsule permettrait une liaison aux récepteurs mannose et éboueurs ("scavenger"), respectivement, impliqués dans la liaison et la phagocytose de *C. perfringens* [46]. Chez la souche 13 de *C. perfringens*, la capsule ne semble pas inhiber la phagocytose par les macrophages comme chez les autres bactéries à Gram positif. Il a également été rapporté que *C. perfringens* pouvait persister suite à la phagocytose [48]. Il pourrait donc être avantageux pour cette bactérie d'être phagocytée car *C. perfringens* ne serait pas tué par la phagocytose et le milieu intracellulaire pourrait offrir plus de nutriments et une concentration en oxygène plus faible [46].

*C. perfringens* peut croître à un pH entre 5.5 et 8.0 ainsi qu'à une température entre 20 et 50°C (optimale à 43°C) [41, 49]. Ce clostridie est aérotolérant mais croît mieux en conditions anaérobiques. Sur gélose au sang de mouton, les colonies sont circulaires, bombées, grises à jaunes-grises, transparentes avec une surface brillante et ont un diamètre de 2 à 5 mm. D'autres morphologies peuvent aussi être détectées, soit des colonies rugueuses au contour en lobes ou des colonies plates à la surface irrégulière et au contour filamenteux [41]. *C. perfringens* produit une double zone d'hémolyse, une première zone de lyse complète (hémolyse  $\beta$ ) due à la toxine thêta, et une deuxième zone de lyse incomplète (hémolyse  $\alpha$ ) due à la toxine alpha [41]. D'autres milieux peuvent également être utilisés pour l'isolement de *C. perfringens*. Une gélose sang supplémentée d'alcool phényléthylique (PEA), qui inhibe la croissance des bacilles à Gram négatif, peut être utilisée pour favoriser l'isolement de *C. perfringens* [42]. L'utilisation d'un milieu CMM (Cooked meat medium) permet également de favoriser la croissance des bactéries anaérobies [50]. Un autre milieu fréquemment utilisé est l'agar Shahidi-Ferguson-Perfringens (SFP), sélectif pour l'isolement de *C. perfringens* [51]. Il contient de la kanamycine et de la polymyxine B, pour la sélectivité, ainsi qu'une émulsion de jaunes d'œuf pour détecter la production de lécithinase. Les colonies de *C. perfringens* sur ce milieu sont noires, dû à la production de H<sub>2</sub>S, et entourées d'une zone de précipitation indiquant la production de lécithinase.

### 1.3 Facteurs de virulence

Les souches de *C. perfringens* sont divisées en 5 toxinotypes (A, B, C, D et E) selon la production de quatre toxines majeures létales, soit alpha ( $\alpha$ ), bêta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) et iota ( $\iota$ ) (Tableau I) <sup>[52]</sup>.

**Tableau I** : Classification de *C. perfringens* selon les toxines produites

Toxinotype	Toxines			
	Alpha ( $\alpha$ )	Bêta ( $\beta$ )	Epsilon ( $\epsilon$ )	Iota ( $\iota$ )
A	X			
B	X	X	X	
C	X	X		
D	X		X	
E	X			X

#### 1.3.1 Toxine alpha ( $\alpha$ )

La toxine alpha ( $\alpha$ ) est une métalloenzyme, associée au zinc <sup>[53]</sup>, possédant une activité phospholipase C et une activité sphingomyélinase. Elle est composée de 370 acides aminés et sa structure comprend un domaine catalytique, à l'extrémité N-terminale, ainsi qu'un domaine de liaison à la double couche de phospholipides, à son extrémité C-terminale <sup>[54]</sup>. Il a été démontré que le récepteur cellulaire primaire de la toxine alpha est le ganglioside GM1a <sup>[55]</sup>. Les deux activités sont responsables de la cytotoxicité, de la nécrose et de l'hémolyse observées lors de l'infection (Möllby, 1978, cité par Rood and Cole, 1991 <sup>[2]</sup>). Lorsqu'elle est présente en faible quantité dans les cellules, la toxine alpha cause un stress oxydatif <sup>[56]</sup>. De plus, il semble que les radicaux  $O_2^-$ , peroxyde d'hydrogène et  $OH^-$  seraient impliqués dans les effets cytotoxiques et myotoxiques. En effet, l'utilisation dans un modèle murin de gangrène gazeuse de l'edaravone, un capteur de radicaux hydroxyles, réduirait la myonécrose et la mortalité due à *C. perfringens* <sup>[56]</sup>. Cette toxine semble être le facteur de virulence le plus important produit par les isolats de *C. perfringens* causant la gangrène gazeuse <sup>[2]</sup>. En effet, il a été démontré par complémentation croisée que la toxine alpha de *C. perfringens* était suffisante pour induire la gangrène gazeuse <sup>[57]</sup>. Cette toxine est produite par les cinq toxinotypes et est codée par le gène *plc*, retrouvé



sur le chromosome. Ce gène est situé sur le même locus chez tous les types, soit près de l'origine de réplication *oriC* [45].

### 1.3.2 Toxine bêta ( $\beta$ 1)

La toxine bêta est une protéine monomérique soluble de 35 kDa sensible à la chaleur et très sensible à la trypsine (Jolivet-Reynaud, 1986, cité par Rood et Cole [2]) [58]. Elle fait partie de la famille des toxines heptamériques formant des pores [59]. L'activité de la toxine est létale et nécrotique. Elle est sécrétée sous forme de monomères qui, par la suite, s'assemblent pour créer des pores sélectifs pour les cations [60, 61]. Elle est codée par le gène *cpb*, qui est retrouvé sur un plasmide d'environ 90 kb [62-64]. Chez le lapin, la toxine bêta est essentielle et suffisante pour induire les lésions intestinales nécrotiques typiques des infections à *C. perfringens* [65, 66]. La toxine peut également augmenter la perméabilité capillaire chez la souris, ce qui indique qu'elle peut agir directement sur le système vasculaire [67]. Dans un modèle porcin d'entérite, la toxine bêta a été détectée au niveau des cellules endothéliales microvasculaires durant les stades précoce et tardif des lésions [68]. La toxine induirait la mort des cellules endothéliales porcines par un déséquilibre ionique ainsi que par l'activation de la nécroptose, cascades d'évènements biochimiques dépendants du calcium.

### 1.3.3 Toxine epsilon ( $\epsilon$ )

La toxine epsilon est responsable d'entérotaxémies létales chez le mouton, la chèvre, le veau et chez plusieurs animaux domestiques [69]. L'absorption de la toxine se ferait via la muqueuse intestinale, puis elle se propagerait à tous les organes par le biais de la circulation sanguine, induisant ainsi une élévation de la pression sanguine et un œdème des organes [4, 70]. La toxine epsilon peut également traverser la barrière hémato-encéphalique ce qui provoque un œdème des vaisseaux sanguins, des dommages aux neurones et un relâchement excessif d'acide glutamique, neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux central, par les neurones de l'hippocampe [71]. Cet excès d'acide glutamique induirait un efflux massif de calcium extracellulaire vers l'intérieur de la cellule et une libération du calcium intracellulaire

du réticulum endoplasmique. Ceci mènerait à l'activation de plusieurs enzymes et à la dégradation de la cellule neuronale [72]. La protoxine est codée par le gène *etx*, retrouvé sur un plasmide de 65 kb, et doit être clivée par une protéase après la sécrétion pour son activation [64, 73-75]. L'activation se fait normalement dans le système digestif par l'action de la trypsine, de l' $\alpha$ -chymotrypsine ou de la protéase lambda de *C. perfringens* [76]. La protéase clive 13 et 29 acides aminés aux extrémités N-terminale et C-terminale, respectivement. Suite à la liaison de la toxine aux cellules, une heptamérisation est observée suivie de la formation de pores [76]. De plus, il a été démontré que les cavéolines 1 et 2 favorisaient l'oligomérisation de la toxine, augmentant sa cytotoxicité [77]. Un domaine putatif impliqué dans la formation de pore a été décrit au niveau des acides aminés 151 à 180 [78]. En effet, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que des mutations dans ce domaine résultaient en une baisse de la cytotoxicité, à des changements dans la sélectivité ainsi qu'à un blocage partiel des pores.

#### 1.3.4 Toxine iota (*i*)

La toxine iota est constituée de deux protéines indépendantes, essentielles à la cytotoxicité, soit une protéine de liaison (Ib) et une protéine contenant l'activité enzymatique (Ia) [79]. Les deux protéines sont codées par les gènes *iap* et *ibp*, retrouvés sur un plasmide d'environ 135 kb [1, 75, 80]. La protéine Ib se lierait à son récepteur à la surface de la membrane cellulaire puis se déplacerait vers les radeaux lipidiques. Par la suite, la protéine Ia viendrait se lier à l'oligomère Ib et les deux composants seraient internalisés par endocytose médié par un récepteur [81, 82]. La protéine de choc thermique Hsp90 est essentielle pour la toxicité de la toxine binaire iota [83]. Elle serait impliquée dans la translocation de la protéine Ia de l'endosome au cytosol. Cette translocation s'effectuerait entre la formation de l'endosome précoce et de l'endosome tardif, car elle est dépendante de conditions acides [84]. Elle nécessiterait aussi un gradient de potentiel membranaire. La protéine Ia contient un domaine enzymatique conservé retrouvé chez d'autres toxines ADP-ribosilantes. Cette protéine catalyserait donc l'ADP-ribosylation des monomères d'actine, résultant en la dépolymérisation des filaments d'actine et l'inhibition de certaines fonctions cellulaires [85, 86]. Ces effets sont irréversibles et mènent à une mort

cellulaire retardée dépendante des caspases <sup>[87]</sup>. Il a été démontré qu'en plus de son rôle de protéine de liaison, la sous-unité Ib possédait également une activité cytotoxique via l'induction de la nécrose des cellules <sup>[88]</sup>.

### 1.3.5 Entérotoxine (CPE)

L'entérotoxine (CPE) ne fait pas partie des toxines majeures mais elle est le facteur de virulence responsable des empoisonnements alimentaires dus à *C. perfringens*. Environ 5 % des souches de *C. perfringens* produisent cette entérotoxine qui endommagerait les cellules épithéliales intestinales en formant des pores dans la membrane cellulaire <sup>[52, 89]</sup>. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 319 acides aminés codée par le gène *cpe*, qui peut être chromosomique ou plasmidique, et n'est exprimée que lors de la sporulation <sup>[1]</sup>. En effet, la synthèse de l'entérotoxine est contrôlée par les facteurs sigma SigE et SigK, qui contrôlent également la sporulation <sup>[90]</sup>. La toxine, qui est relâchée suite à l'autolyse de la bactérie sporulante, se lierait à son récepteur, soit les claudines 3 et 4, via un domaine de liaison situé en C-terminale <sup>[91-93]</sup>. Elle peut se lier également aux claudines 8 et 14 mais avec une plus faible affinité <sup>[94]</sup>. De plus, cette liaison se ferait grâce à des liens électrostatiques <sup>[89]</sup>. Suite à la liaison, l'entérotoxine recruterait plusieurs complexes CPE-claudine (CH-1) pour créer de larges complexes moléculaires de ~450 kDa. Il a été suggéré que la toxine CPE présente dans ce complexe de ~450 kDa s'intégrerait partiellement dans la membrane plasmidique, formant ainsi des pores <sup>[95, 96]</sup>. Ce recrutement se ferait grâce au domaine cytotoxique en N-terminale <sup>[97]</sup>. La région TM1 de la protéine CPE (acides aminés 81 à 106) formerait une structure en épingle à cheveux  $\beta$  qui serait impliquée dans l'insertion de la toxine ainsi que dans la formation de pores <sup>[98]</sup>. Il a été démontré que la partie C-terminale non-cytotoxique de la toxine (acides aminés 184 à 319) briserait la structure des jonctions serrées et augmenterait la perméabilité paracellulaire en séquestrant les claudines <sup>[99]</sup>. En effet, l'influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  créé par les pores produirait des dommages cellulaires qui permettraient à l'entérotoxine d'accéder aux jonctions serrées et de former un complexe CH-2 de ~600 kDa contenant des occludines <sup>[96]</sup>. Suite à la formation de ces complexes, les protéines des jonctions serrées seraient internalisées. Les dommages aux jonctions serrées ainsi que

la mort cellulaire due à l'apoptose et à l'oncose (augmentation du volume cellulaire) augmenteraient la perméabilité paracellulaire, causant de la diarrhée [95].

### 1.3.6 Autres toxines

En plus des quatre toxines majeures et de l'entérotoxine CPE, 15 autres toxines ont été décrites chez *C. perfringens* (Tableau II).

La toxine bêta-2 ( $\beta_2$ ) possède une activité comparable à celle de la toxine bêta-1 et elle est associée aux infections du système digestif chez les animaux [100]. Elle est létale chez la souris et peut également causer de la nécrose hémorragique de la paroi intestinale chez le cochon d'Inde. La toxine bêta-2 est codée par le gène *cpb2*, qui est localisé sur un plasmide de 50 kb [100]. Ce gène code pour une protéine de 31 kDa qui est clivée de façon post-transcriptionnelle en une toxine active de 28 kDa [75, 100]. Les recherches n'ont pas démontré si l'activité de la toxine bêta-2 était intracellulaire ou au niveau de la membrane cellulaire. Toutefois, suite à des colorations immunohistochimiques ciblant la toxine, celle-ci semble rester autour des bactéries, ce qui suggère que l'action de la toxine serait locale [101].

**Tableau II** : Toxines décrites chez *C. perfringens*

Toxine	Gène	Localisation	Poids moléculaire	Mode d'action
$\alpha$	<i>plc</i>	Chromosome	43 kDa	Phospholipase C / sphingomyélinase
$\beta_1$	<i>cpb1</i>	Plasmide	35 kDa	Formation de pores
$\beta_2$	<i>cpb2</i>	Plasmide	31 kDa	Formation de pores ou alteration de la perméabilité membranaire?
$\epsilon$	<i>etx</i>	Plasmide	34,25 kDa	Alteration de la perméabilité membranaire
$\iota$ (Ia)	<i>iap</i>	Plasmide	47,5 kDa	ADP-ribosylation de l'actine
$\iota$ (Ib)	<i>ibp</i>	Plasmide	71,5 kDa	Transport de la toxine
Entérotoxine (CPE)	<i>cpe</i>	Chromosome/plasmide	35 kDa	Formation de pores
$\delta$	<i>cpd</i>	?	42 kDa	Hémolysine, spécifique au ganglioside GM2
$\theta$	<i>pfoA</i>	Chromosome	51 kDa	Hémolysine, spécifique au cholestérol
$\kappa$	<i>colA</i>	Chromosome	116 kDa	Collagénase, gélatinase
$\lambda$	<i>lam</i>	Plasmide	36 kDa	Protéase
$\mu$	<i>nagH</i>	Chromosome	182 kDa	Hyaluronidase
$\nu$	?	?	?	Dnase
Neuraminidases	<i>nanH-J</i>	Chromosome	42,8-129 kDa	Neuraminidase (sialidases)
Uréase	<i>ureA-C</i>	Plasmide	?	Uréase
NetB	<i>netB</i>	Chromosome	33 kDa	Formation de pores
TpeL	<i>tpeL</i>	Plasmide	191 kDa	Glycosyltransférase

Modifié de Petit *et al.*, 1999. [1, 6, 102-108]

La toxine thêta est codée par le gène *pfoA*, qui est retrouvé sur le chromosome, et code pour une protéine de 51 kDa <sup>[104]</sup>. La toxine thêta ( $\theta$ ) ou perfringolysine O (PFO) est un membre de la famille des cytolysines dépendantes du cholestérol. Ces toxines nécessitent de hautes concentrations en cholestérol pour pouvoir s'insérer dans la membrane cellulaire et former des pores en tonneau  $\beta$ . Suite à la liaison de la PFO, une oligomérisation a été observée, formant un pré-pore qui pouvait contenir jusqu'à 50 monomères, puis des changements de structure permettaient la formation d'un tonneau  $\beta$  rigide transmembranaire <sup>[109]</sup>. La production de la PFO est également dépendante de la présence de l'opéron *agr* <sup>[110]</sup> et est régulée par le régulateur global CodY <sup>[111]</sup>.

TpeL est une toxine découverte par Amimoto *et al.* en 2007 et fait partie de la famille des toxines clostridiales glucosylantes <sup>[102, 112]</sup>. Elle est produite par des souches de type A, B et C et elle est codée par le gène *tpeL*, produisant une protéine de 191 kDa. Le gène *tpeL* a été localisé sur des plasmides de différents poids moléculaires (~ 65 kb à ~ 95 kb) <sup>[106]</sup>. Cette toxine a été retrouvée au sein d'une région qui contient également le gène *tpeE*, codant pour une protéine de bactériophage de type holine, ainsi que le gène *tpeR*, qui code pour une protéine de la famille TcdR (facteurs sigma alternatifs) <sup>[113]</sup>. Il a été démontré que TpeR jouait un rôle critique dans la production de la toxine TpeL. En effet, il a été observé qu'un mutant isogénique *tpeR* ne produisait plus de toxine TpeL alors que le mutant complétement retrouvait un niveau de production similaire à la souche sauvage <sup>[113]</sup>. Contrairement aux autres membres de la famille des toxines clostridiales glucosylantes, la toxine TpeL ne possède pas de domaine polypeptidique répété en C-terminal, impliqué dans l'attachement à la cellule cible. Toutefois, il a été démontré que la protéine LRP1 agissait comme récepteur cellulaire pour la toxine TpeL, qui contient un domaine de liaison au récepteur en C-terminal <sup>[114]</sup>. Nagahama *et al.* (2011) ont démontré que, chez les cellules Vero, l'effet cytotoxique de TpeL était dû à des modifications de Rac1 et Ras *in vitro* via une glycosylation en utilisant le UDP-N-acétyl-glucosamine et le UDP-glucose comme donneur de sucre <sup>[115]</sup>. Il a également été démontré que la toxine TpeL pouvait induire une apoptose des cellules HeLa <sup>[116]</sup>. La toxine est aussi exprimée lors de la sporulation et a été détectée dans le

compartiment de la cellule mère <sup>[117]</sup>. De plus, l'expression de la toxine TpeL est réprimée par le glucose et sa régulation dépend de la phase de croissance <sup>[113]</sup>.

La toxine NetB ("Necrotic enteritis toxin B"), codée par le gène chromosomal *netB*, est un facteur de virulence retrouvé dans certains cas d'entérites nécrotiques chez le poulet <sup>[6]</sup>. En effet, le gène *netB* a été détecté dans 14/18 (78 %) des isolats provenant de cas d'entérites nécrotiques chez des oiseaux en Australie alors que le gène n'a pas été détecté chez les isolats provenant d'autres sources. Toutefois, dans une étude américaine, le gène *netB* n'a été détecté que dans 15 % des isolats provenant de poulet <sup>[118]</sup>. De plus, dans cette même étude, *netB* a été détecté chez une souche provenant d'un abcès chez une vache. Keyburns *et al.* (2008) ont démontré que lorsqu'il y avait une mutation dans le gène *netB*, une perte de la cytotoxicité était observée <sup>[6]</sup>. De plus, la toxine purifiée a démontré une cytotoxicité envers des cellules hépatiques de poulet (LMH), causant l'arrondissement et la lyse de ces cellules. Des analyses comparatives au niveau des séquences en acides aminés ont également permis de prédire que la toxine NetB était une toxine formant des pores, celle-ci ayant 30 % d'identité avec l'alpha-hémolysine de *Staphylococcus aureus* et 38 % d'identité avec la toxine bêta de *C. perfringens* <sup>[6]</sup>. Des tests de protection osmotique ont permis de confirmer cette hypothèse et de déterminer que la toxine NetB formait des pores cationiques de 1.6 à 1.8 nm <sup>[6, 119]</sup>. Il a également été observé qu'une mutation de l'acide aminé 41 (K41H) abolissait l'oligomérisation de la toxine ainsi que sa capacité à former des pores <sup>[120]</sup>.

La toxine delta ( $\delta$ ) est une des hémolysines relâchées par certaines souches de *C. perfringens* type B et C <sup>[121]</sup>. La toxine delta, codée par le gène *cpd*, est composée de 318 acide aminés, dont les 28 en N-terminale correspondent au peptide signal <sup>[103]</sup>. La toxine sécrétée est une protéine basique (pI 9.1) de 32.6 kDa. Elle présente une importante homologie avec la toxine bêta (43 % identité) et la toxine NetB (40 % identité) de *C. perfringens* ainsi qu'avec d'autres toxines formant des pores dont la toxine alpha (32 % identité) et les leukotoxines (32 % et 22 % identité) de *S. aureus* <sup>[103]</sup>. La toxine delta hémolyse spécifiquement les érythrocytes provenant des porcs, des chèvres et des moutons <sup>[121]</sup>. Elle est également cytotoxique pour d'autres types cellulaires dont les macrophages de lapins, les monocytes humains ainsi que les

plaquettes sanguines provenant des chèvres, des lapins, des humains et des cochons d'Inde <sup>[103, 122, 123]</sup>. La cytotoxicité sélective de la toxine delta est due à son attachement spécifique au ganglioside G<sub>M2</sub>. Il a été démontré que l'activité hémolytique ainsi que l'attachement spécifique de la toxine aux érythrocytes étaient inhibés par la présence de ganglioside GM<sub>2</sub> <sup>[121, 124]</sup>. L'effet cytotoxique de la toxine serait dû à la formation de pores anioniques au niveau de la membrane cellulaire <sup>[103]</sup>. Ces pores seraient causés par la forme heptamérique de la toxine et auraient un diamètre d'environ 10 nm <sup>[125]</sup>.

La toxine kappa ( $\kappa$ ), ou collagénase, a été isolée et purifiée de la souche *C. perfringens* type C NCIB 10662 <sup>[126]</sup>. Le gène structural de la collagénase, *colA*, est localisé sur le chromosome et code pour une pré-collagénase de 126 kDa, qui est par la suite clivée en une collagénase extracellulaire de 116 kDa qui est homologue à la collagénase colH de *Clostridium histolyticum* <sup>[127]</sup>. En plus de contenir un peptide signal, le peptide 'leader' contient une séquence cible pour la collagénase (PLGP) ce qui suggérerait que le précurseur serait clivé par un processus autocatalytique. La protéine mature contient également un domaine consensus de liaison au zinc HEXXH <sup>[126]</sup>. Awad *et al.* (2000) ont démontré, grâce à des mutants, que la toxine kappa n'était pas un facteur de virulence majeur dans les cas de myonécrose <sup>[128]</sup>. Son rôle exact dans la virulence reste encore à être déterminé.

La toxine lambda ( $\lambda$ ), ou caséinase, est produite par quelques souches de type B, D et E <sup>[129]</sup>. Cette toxine est codée par le gène *lam*, retrouvé sur un plasmide de 70 kb, qui code pour une métalloprotéase liant le zinc de 36 kDa semblable aux thermolysines <sup>[129]</sup>. La toxine lambda est sécrétée comme une proenzyme contenant une longue séquence précurseur de 200 acides aminés. La protéine mature contient le motif HEXXH de liaison au zinc ainsi que des séquences consensus retrouvées au sein de la famille des protéases thermolysines <sup>[129]</sup>. La toxine purifiée peut dégrader plusieurs substances biologiques, dont le collagène, la fibronectine, le fibrinogène, l'immunoglobuline A, ainsi que le composant C3 du complément <sup>[129]</sup>. Il a été également démontré par la même équipe que lorsque la toxine était injectée de façon intradermique chez la souris, il y avait une dégradation des tissus conjonctifs. De plus, il a été observé que la toxine lambda pouvait activer de façon extracellulaire les

toxines epsilon et iota (Willis,A, 1969 cité par Harkness J, 2012) <sup>[130]</sup>. Toutefois, son rôle exact dans la virulence reste à être déterminé.

La toxine mu ( $\mu$ ), ou hyaluronidase, est codé par le gène *nagH*, qui est retrouvé sur le chromosome de *C. perfringens* à moins de 30 kb du gène *colA* (toxine kappa) <sup>[131]</sup>. La toxine est une protéine multimodulaire de 182 kDa qui comprend un module catalytique en N-terminal, quatre modules de la famille 32 liant les glucides, trois modules putatifs FIVAR liant les glucides ainsi qu'un module putatif liant le calcium en C-terminal <sup>[108]</sup>. La toxine mu a été impliquée dans l'établissement et la progression de la gangrène gazeuse. En effet, elle dégraderait l'acide hyaluronique, un constituant important des tissus conjonctifs (Baker *et al.* (1956) cité par Chitayat *et al.* (2008)) <sup>[108]</sup>. La toxine faciliterait également la propagation de *C. perfringens* et de la toxine alpha dans les tissus infectés (Smith (1979) cité par Chitayat *et al.* (2008)) <sup>[108]</sup>. Pour ce qui est de la toxine nu ( $\nu$ ), très peu d'informations sont disponibles pour le moment. La toxine agirait comme une DNase <sup>[1]</sup>.

Trois neuraminidases, ou sialidases, ont été décrites chez *C. perfringens*. Ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les résidus d'acide sialique retrouvés au niveau de la membrane de plusieurs cellules de mammifères <sup>[105]</sup>. Elles sont codées par les gènes *nanH*, *nanI* et *nanJ*, qui sont situés dans une région conservée du chromosome <sup>[3, 132]</sup>. NanH est une sialidase non sécrétée (~ 43 kDa) alors que les sialidases NanI et NanJ (~ 77 kDa et ~ 129 kDa, respectivement) sont sécrétées. Au niveau nucléotidique, *nanH* ne possède que 19 % d'identité avec *nanI* et *nanJ*, alors que ces deux exoenzymes possèdent 57 % d'identité <sup>[107]</sup>. NanJ est composé d'un domaine central catalytique et de cinq domaines accessoires dont les fonctions ne sont pas connues. Toutefois, les deux domaines en N-terminal présentent une identité au niveau des acides aminés avec des domaines de liaison aux glucides de la famille 32 et 40. NanI possède un domaine catalytique ainsi qu'un domaine de liaison aux glucides de la famille 40 alors que NanH ne possède qu'un domaine catalytique <sup>[133]</sup>. Hiscox *et al.* (2013) ont démontré qu'en plus d'être régulée par les régulateurs VirRS et RevR, l'expression des gènes *nanI* et *nanJ* était positivement régulée par le senseur histidine kinase orphelin ReeS <sup>[134]</sup>. Il a été démontré, grâce à des mutants NanI et NanJ de la souche 13, que ces sialidases pouvaient augmenter les effets cytotoxiques



de la toxine alpha *in vitro* <sup>[135]</sup>. Toutefois, cette équipe a également démontré que la production de sialidases n'était pas nécessaire dans l'établissement de la gangrène gazeuse dans un modèle murin. Li *et al.* (2011) ont démontré que lors d'une infection intestinale due à un *C. perfringens* type D, la trypsine activerait NanI qui, par la suite, augmenterait l'activité de la toxine epsilon et permettrait la colonisation intestinale de *C. perfringens* <sup>[107]</sup>. Il a également été démontré que NanI pouvait contribuer à l'attachement intestinal et la colonisation des souches de type A ou C lors de cas de diarrhée associée aux antibiotiques et de diarrhée sporadique. Toutefois, cette sialidase ne semble pas essentielle dans les cas aigus d'empoisonnement alimentaire dû au type A ainsi que dans les cas d'entérite nécrotique sévère ("enteritis necroticans") dû au type C <sup>[136]</sup>.

*C. perfringens* peut produire, en plus des neuraminidases, une uréase qui est codée par l'opéron *ureABC* <sup>[137]</sup>. Les uréases sont des métalloenzymes contenant du nickel qui hydrolysent l'urée en ammoniac et en carbamate <sup>[138]</sup>. Il a été déterminé par Dupuy *et al.* (1997) qu'environ 2 % des souches de *C. perfringens* seraient uréolytiques. Les gènes *ureABC* ont été localisés sur des plasmides de différents poids moléculaires qui pouvaient également porter d'autres facteurs de virulence comme les toxines CPE, epsilon et iota <sup>[137]</sup>. L'expression de ces gènes est induite lorsque les bactéries sont dans un milieu pauvre en azote mais est réprimée en présence d'urée. Au niveau immunologique, l'uréase de *C. perfringens* est apparentée à l'uréase bien caractérisée d'*Helicobacter pylori* <sup>[137]</sup>.

## **1.4 Infections**

*C. perfringens* est responsable de plusieurs maladies chez l'humain ainsi que chez les animaux, qu'ils soient domestiques ou sauvages. Elle est une des bactéries pathogènes les plus souvent rencontrées en clinique <sup>[4, 139]</sup>.

### **1.4.1 Humain**

Chez l'humain, *C. perfringens* est rencontré dans plusieurs conditions cliniques : infections de plaies, cellulite, septicémie intra-abdominale, cystite gangréneuse, infection post-avortement, hémolyse intravasculaire, bactériémie,

pneumonie, empyème et abcès du cerveau (Gorbach, 1998, cité par Allen *et al.*, 2003<sup>[42]</sup>). Toutefois, la gangrène gazeuse et les intoxications alimentaires sont les deux conditions les plus souvent rencontrées lors d'infection à *C. perfringens*.

#### 1.4.1.1 Gangrène gazeuse

La gangrène gazeuse est souvent associée à des traumatismes ou des chirurgies, où la bactérie peut être introduite dans des lésions profondes ou des plaies chirurgicales. Aux États-Unis, on estime qu'il y aurait environ 1000 cas d'infections nécrosantes des tissus mous par année<sup>[140]</sup>. Dans les premières étapes de l'infection, lorsque les phagocytes s'infiltrent dans la plaie, *C. perfringens* est capable d'échapper au phagosome et peut persister dans le cytoplasme des macrophages même sous des conditions aérobiques<sup>[48]</sup>. Lorsqu'il y a un environnement anaérobie adéquat pour sa croissance, *C. perfringens* commence à se multiplier, détruisant les muscles en quelques heures grâce à la production des toxines alpha et thêta<sup>[141]</sup>. Le diagnostic de la gangrène gazeuse se fait principalement par l'évaluation clinique de la condition. Une coloration de Gram est également effectuée sur les fluides drainés de la plaie pour confirmer la présence du pathogène<sup>[142]</sup>. Malgré l'utilisation d'antibiotiques, surtout la pénicilline, et le débridement des plaies, dans plusieurs cas de gangrène gazeuse, l'amputation du membre est souvent le traitement de choix<sup>[142]</sup>. Des études ont toutefois montrées que des traitements en hyperbare en complément aidait à traiter l'infection<sup>[143-145]</sup>. L'oxygène hyperbare agit de plusieurs façons : il inhibe la production de la toxine alpha, il inhibe la croissance de *C. perfringens* au sein des tissus et augmente l'efficacité des neutrophiles<sup>[143]</sup>.

#### 1.4.1.2 Empoisonnement alimentaire

Les intoxications alimentaires dues à *C. perfringens* sont classées au troisième rang des infections d'origine alimentaire aux États-Unis, en termes d'incidence, causant environ 250,000 cas annuellement<sup>[146]</sup>. Les symptômes liés à une intoxication à *C. perfringens* type A se limitent à la personne infectée et se résolvent à l'intérieur de 24 heures<sup>[52]</sup>. L'évènement clé de l'infection est la mauvaise manipulation des aliments, surtout le poulet et le bœuf. La non-réfrigération des aliments cuits peut permettre la germination des spores et la multiplication des cellules végétatives. Lorsque les aliments contaminés sont consommés, les cellules

végétatives vont se multiplier dans l'intestin, sporuler puis produire et relâcher l'entérotoxine CPE, causant les symptômes de diarrhée et de crampe <sup>[52]</sup>. L'initiation de la sporulation chez *C. perfringens* survient lorsque la bactérie se retrouve face à des conditions de carence nutritionnelle <sup>[147]</sup>. Suite à la phosphorylation du régulateur principal de la sporulation (Spo0A), la cellule bactérienne se divise afin de produire une cellule-mère ainsi qu'une préspore. Par la suite, plusieurs étapes mènent à la formation de la spore : 1) la cellule-mère engouffre la préspore, 2) la préspore synthétise sa paroi ainsi que son cortex, 3) le noyau de la préspore se déshydrate, 4) la préspore se couvre de son manteau protéique puis finalement 5) la cellule-mère se lyse et relâche la spore mature dans l'environnement <sup>[147]</sup>. La germination des spores est initiée par la présence de germinants nutritionnels, soit des acides aminés, des dérivés de purine et des sucres <sup>[148]</sup>.

Les cas d'entérite nécrotique sévère ("enteritis necroticans" ou "pigbel") sont des infections mortelles causées par *C. perfringens* type C et sont associés à un haut taux de mortalité si l'infection n'est pas diagnostiquée et traitée tôt <sup>[149]</sup>. Cette infection est responsable de 10 % de toutes les mortalités, et de 50 % des mortalités d'enfants entre 6 et 10 ans dans les montagnes de la Papouasie-Nouvelle Guinée <sup>[150]</sup>. Dans les pays industrialisés, seul quelques cas ont été identifiés <sup>[149]</sup>. La prévention est le point majeur du contrôle des intoxications alimentaires à *C. perfringens*, soit des méthodes appropriées de manipulation des aliments et de réfrigération pour éviter la prolifération de la bactérie dans les aliments. Le traitement des intoxications vise à soulager les symptômes, surtout dans les cas de personnes âgées ou de patients compromis <sup>[52]</sup>. Les cas d'entérite nécrotique sévère sont traités à l'aide d'antimicrobiens, mais pour les cas trop avancés, l'excision chirurgicale de la portion intestinale en nécrose suivi d'un traitement aux antimicrobiens est prescrit <sup>[149]</sup>.

## **1.4.2 Poulet**

### **1.4.2.1 Entérite nécrotique**

L'entérite nécrotique est une infection sévère fréquemment rencontrée chez le poulet et qui est causée par *C. perfringens* type A et, en plus faible proportion, par le

type C <sup>[69, 151]</sup>. Les poussins peuvent acquérir le pathogène de l'environnement des incubateurs, des porteurs sains ainsi que des oiseaux atteints de la forme sous-clinique d'entérite nécrotique <sup>[152]</sup>. Le taux de mortalité de cette infection se situe entre 0 et 50 % des oiseaux infectés <sup>[153]</sup>. L'infection peut être exacerbée par la présence de coccidies en co-infection <sup>[154-156]</sup>. La nature de la diète est un facteur non-bactérien majeur dans l'établissement de *C. perfringens* et dans le développement de l'infection. L'incidence de l'entérite nécrotique chez les oiseaux bénéficiant d'une diète à base de blé ou d'orge est 6-10 fois supérieure que chez les oiseaux ayant une diète à base de maïs, et le taux de mortalité est 2-3 fois plus élevé <sup>[152, 157]</sup>. Cela serait dû à la préférence nutritionnelle et à la disponibilité des nutriments pour *C. perfringens* dans les diètes à base de blé ou d'orge. Un autre facteur affectant l'incidence de l'entérite nécrotique est la forme de la nourriture administrée aux oiseaux. En effet, les petites particules sont plus digestibles pour l'oiseau et plus facilement métabolisées par *C. perfringens*, comparativement à la nourriture en capsule.

Deux toxines, soit la toxine alpha et NetB, ont été impliquées dans le développement de l'entérite nécrotique <sup>[6, 105]</sup>. Suite à des analyses de séquençages à haut débit, Lepp *et al.* (2010) <sup>[5]</sup> ont trouvé 31 cadres de lecture ouverts (ou open reading frames, ORFs) uniques à tous les isolats de *C. perfringens* provenant de cas d'entérites nécrotiques. Ces cadres de lecture ouverts ont été regroupés en trois loci hautement conservés associés à l'entérite nécrotique, désignés NELoc-1 (42 kb), NELoc-2 (11.2 kb) et NELoc-3 (5.6 kb). Le locus NELoc-1 comprend le gène *netB* et 36 autres gènes, dont deux gènes de leucocidines (protéines semblables aux internalines) et un gène codant pour une protéine avec un domaine ricine, retrouvé dans les protéines inactivant le ribosome <sup>[158]</sup>. Les loci NELoc-1 et NELoc-3 ont été localisés sur des plasmides d'environ 85 et 70 kb, respectivement, et suite au séquençage des régions flanquantes des trois loci, des similarités ont été retrouvées avec des plasmides conjugatifs déjà caractérisés de *C. perfringens* <sup>[5]</sup>.

Le diagnostic de la maladie se fait par l'observation des signes cliniques caractéristiques à la ferme et lors de l'examen macroscopique. Les cas d'entérites nécrotiques peuvent être traités avec de la lincomycine, de la bacitracine, de

l'oxytétracycline, de la pénicilline et de la tylosine dans l'eau ou de la bacitracine, de la lincomycine, de la virginiamycine et de la pénicilline dans la nourriture <sup>[159]</sup>. Au niveau du contrôle de l'infection, une réduction de l'exposition à la coccidiose et aux diètes inappropriées permet de diminuer l'incidence de l'entérite nécrotique chez la volaille. De plus, la bacitracine et l'avilamycine peuvent être utilisées en usage préventif afin de contrôler les éclosions d'entérite nécrotique <sup>[160]</sup>. Toutefois, l'utilisation des promoteurs de croissance est de moins en moins fréquente, et est même bannie de l'Union Européenne, car des inquiétudes sont présentes quant au transfert de la résistance antimicrobienne aux pathogènes humains, à la présence de résidus antimicrobiens dans les aliments ainsi que la sélection de bactéries résistantes de la flore commensale <sup>[152]</sup>.

### **1.4.3 Porc**

#### **1.4.3.1 Entérite due au type C**

Ce type d'infection est fréquent chez les porcelets de 3 jours d'âge, pouvant apparaître dès 12h après la naissance, mais est rarement retrouvé chez des porcs de plus d'une semaine d'âge <sup>[161]</sup>. Le taux de mortalité varie selon la forme de la maladie, pouvant aller jusqu'à 50-60 % de l'élevage, et la perte totale d'une portée provenant d'une truie non-immunisée n'est pas rare <sup>[43, 162]</sup>. Suite à l'ingestion du pathogène, les bactéries s'attachent aux villosités des cellules épithéliales du jéjunum. Il s'ensuit une desquamation des cellules épithéliales et la prolifération de *C. perfringens* au niveau de la membrane basale. Lors de la croissance, les cellules bactériennes synthétisent et excrètent la toxine bêta, le facteur clef de l'infection <sup>[43]</sup>. Le traitement des animaux avec signes cliniques est très peu utile. Les traitements prophylactiques sont l'approche de choix dans ces cas. Afin de prévenir l'infection des porcelets, des antibiotiques, comme l'ampicilline et l'amoxicilline, peuvent être administrés dès la naissance jusqu'à trois jours d'âge. L'administration de bacitracine aux truies avant et après la mise bas peut également être appliqués <sup>[43]</sup>. Au niveau de la prévention de l'infection, la vaccination des truies avec la toxoïde type C au début ou au milieu ainsi qu'à la fin de la gestation apporte la meilleure protection <sup>[163]</sup>.

#### 1.4.3.2 Entérite due au type A

Cette infection est retrouvée chez les porcelets de moins d'une semaine d'âge. La présence de spores serait importante pour le maintien de l'organisme dans l'environnement <sup>[43]</sup>. Les toxines alpha et, surtout, bêta-2 ont été associées aux cas d'entérites <sup>[164]</sup>. En effet, plus de 90 % des isolats d'entérite porcine néonatale sont positifs pour la toxine bêta-2 <sup>[165]</sup>. Toutefois, aucune information n'implique directement une toxine spécifique dans la pathogenèse de cette infection. L'observation de signes cliniques compatibles à l'infection et l'isolement d'un nombre élevé de *C. perfringens* type A, majoritairement CPB2 positifs, suggère fortement un diagnostic d'entérite due à *C. perfringens* type A <sup>[164]</sup>. Le traitement antimicrobien de cette infection a plus de chance de réussir que dans les cas d'entérite de type C. La bacitracine est utilisée soit en prophylaxie chez les truies ou en traitement (Madsen, 1995 cité par Songer et Taylor <sup>[43]</sup>).

#### 1.4.3.3 Gangrène gazeuse (type A)

Les cas de gangrène gazeuse chez le porc sont normalement dus à une source endogène. Il arrive qu'il y ait une forte incidence de l'infection à l'intérieur d'un même élevage. Ceci est souvent dû à une complication suite à l'injection de préparations contenant du fer pour la prévention de l'anémie nutritionnelle. Dans ces cas, la mortalité au sein du troupeau peut approcher de 50 % <sup>[43]</sup>. Il a été démontré que les toxines alpha et thêta jouaient un rôle local et systémique dans l'infection <sup>[128]</sup>. La prévention de la contamination des plaies profondes est un point essentiel pour éviter l'installation de la gangrène gazeuse. L'immunisation des animaux est basée sur une protection anti-CPA avec des vaccins à base de toxoïde ou de bactérine et toxoïde <sup>[43]</sup>. Le traitement antibiotique de cette infection peut être efficace si l'antibiotique, soit la pénicilline, est administré tôt durant l'infection (Jaartsveld *et al.*, 1962, cité par Songer et Taylor <sup>[43]</sup>).

## **1.5. Résistance aux antibiotiques**

### **1.5.1 Résistances naturelles**

Très peu de résistances naturelles ont été décrites chez les clostridies. Parmi celles-ci, on retrouve, premièrement, la résistance aux aminoglycosides. Le mécanisme d'entrée de cet antibiotique comprend deux phases, l'une ne nécessitant aucun apport d'énergie et l'autre dépendante de l'énergie provenant du système de transport d'électrons dépendant de l'oxygène ou de l'azote. Les bactéries anaérobies strictes ne possédant pas ce système de transport d'électron, les molécules d'aminoglycosides ne peuvent donc pas entrer dans la cellule bactérienne <sup>[166]</sup>. Bryan *et al.* (1979) ont effectivement observé qu'il n'y avait aucune accumulation d'aminoglycosides dans les cellules bactériennes de *Bacillus fragilis* et *C. perfringens* <sup>[167]</sup>. Malgré la résistance naturelle aux aminoglycosides des bactéries anaérobies, quelques gènes de résistance ont été décrits chez *C. perfringens*. Suite à une étude sur la détection de gènes de résistance chez des bactéries à Gram positif, Perreten *et al.* (2005) ont trouvé trois gènes de résistance chez un isolat de *C. perfringens* provenant de l'intestin d'un veau, soit les gènes *aph(3')-III*, *ant(6)-Ia* et *sat4* <sup>[168]</sup>. Ces gènes peuvent être localisés sur un plasmide ou dans le chromosome, et sont souvent retrouvés sur des éléments transposables <sup>[169]</sup>. Le gène *aph(3')-III* code pour une phosphotransférase, qui catalyse le transfert d'un groupement phosphoryl de l'ATP vers l'un des groupements hydroxyl présents sur la molécule d'aminoglycoside. Cette phosphorylation de l'antibiotique atténue fortement sa liaison à sa cible, soit l'ARNr 16S <sup>[170]</sup>. Ce gène apporte une résistance à l'amikacine, à la gentamicine B, à l'isepamicine, à la kanamycine et à la néomycine <sup>[169, 170]</sup>. Le gène *sat4*, quant à lui, code pour une acétyltransférase, qui catalyse l'acétylation de l'un de quatre groupements amine de l'antibiotique. L'acétylation réduit l'affinité des aminoglycosides pour le site accepteur de l'ARNr, situé sur la sous-unité 30S du ribosome <sup>[170]</sup>. Ce gène est impliqué dans la résistance à la streptothricine <sup>[171]</sup>. Quant au gène *ant(6)-Ia*, il code pour une nucléotidyltransférase, qui catalyse la réaction entre l'ATP et l'aminoglycoside, formant ainsi l'aminoglycoside o-adénylé. Ceci a pour effet d'atténuer la liaison de l'antibiotique au ribosome <sup>[170]</sup>. Ce gène est associé à la résistance à la streptomycine <sup>[169]</sup>.

Une autre résistance naturelle décrite est celle envers le triméthoprim. Le triméthoprim agit en interférant avec l'action de la dihydrofolate réductase, inhibant ainsi la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, nécessaire dans la synthèse *de novo* de la thymidine. Chez *C. perfringens*, la résistance est due à l'insensibilité de ses dihydrofolates réductases face à l'action du triméthoprim [172].

### 1.5.2 Résistances acquises

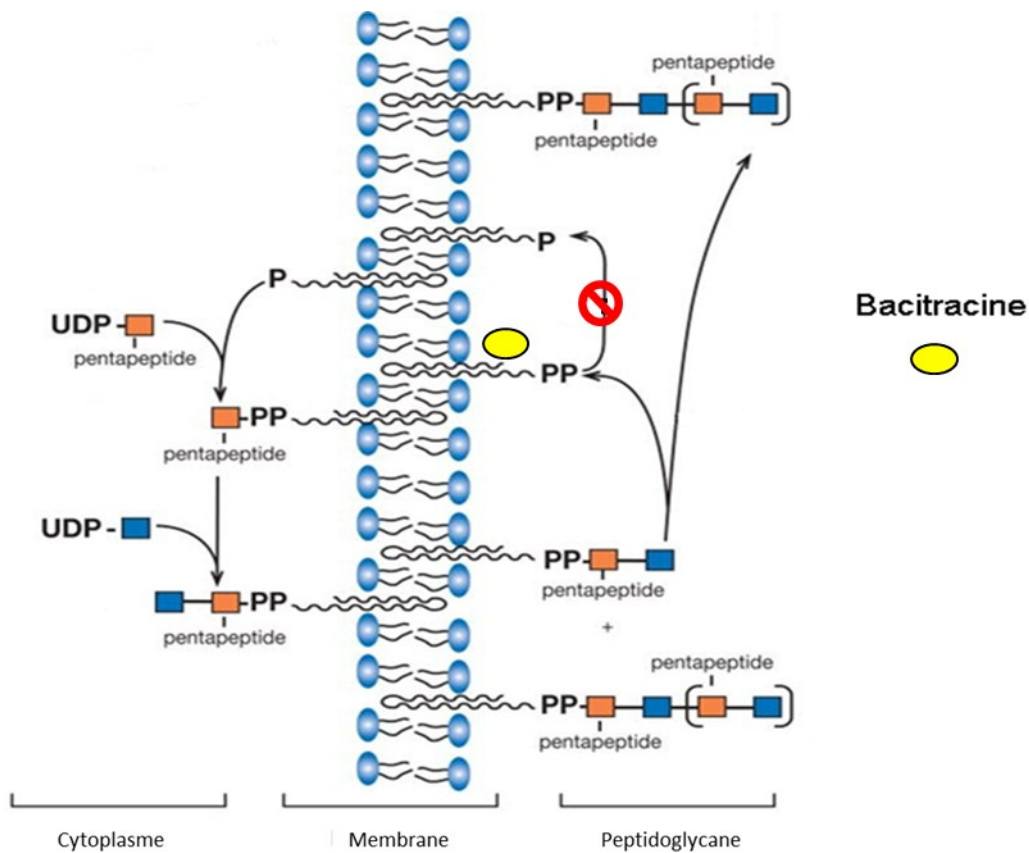
Les trois grands mécanismes bactériens de résistance acquise sont : la présence d'une pompe à efflux qui expulse les antimicrobiens à l'extérieur de la bactérie, l'altération et la protection de la cible ou la modification enzymatique de l'antimicrobien. Ces trois mécanismes ont été retrouvés chez *C. perfringens* et ceux-ci sont décrits en détails dans les prochains paragraphes.

#### 1.5.2.1 Bacitracine

La bacitracine est l'un des antimicrobiens les plus utilisés pour traiter les infections due à *C. perfringens* chez la volaille et le porc. Elle est synthétisée par *Bacillus licheniformis* et par quelques souches de *Bacillus subtilis* de façon non-ribosomale par un complexe multienzyme codée par l'opéron *bacABC* [173]. La bacitracine a besoin de la présence d'un ion métallique divalent pour permettre son activité bactéricide, les plus efficaces étant le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Mn}^{2+}$  et le  $\text{Zn}^{2+}$  [174].

Cet antimicrobien inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne en se liant étroitement à l'undécaprényl pyrophosphate (UPP), ou C55-isoprénol pyrophosphate (Figure 1). L'UPP est le transporteur lipidique responsable de la translocation des monomères de peptidoglycane du cytosol au côté externe de la membrane cytoplasmique, où ils sont ensuite incorporés à la paroi. La liaison de la bacitracine à l'UPP prévient la récupération du transporteur, et ce en bloquant sa déphosphorylation en undécaprényl monophosphate (Figure 1). Les transporteurs n'étant plus recyclés, la synthèse de la paroi est alors inhibée et la croissance bactérienne arrêtée [174].





Source : Modifié de Esko *et al.*, Essentials of glycobiology, 2009

### Figure 1 : Mécanisme d'action de la bacitracine.

La liaison de la bacitracine à l'undécaprényl pyrophosphate (PP) bloque la déphosphorylation du transporteur en undécaprényl monophosphate (P). La synthèse de la paroi est alors inhibée. UDP : Uridine diphosphate, Rectangles oranges : Acide N-acétylmuramique, Rectangles bleus : N-acétylglucosamine

La bacitracine possède un spectre d'action étroit et cible principalement les coques et bacilles à Gram positif mais affecte également quelques bactéries à Gram négatif. Chez l'humain, la bacitracine n'est pas absorbée de façon significative par le système gastro-intestinal et ne peut être utilisée de façon systémique dû à sa néphrotoxicité. Elle est toutefois utilisée de façon topique en poudre ou en onguent sur les plaies, est retrouvée dans les préparations dermatologiques ainsi que dans les onguents pour les yeux et les oreilles. Elle est également utilisée comme promoteur de croissance chez le porc et la volaille dans plusieurs pays dont le Canada. À

l'intérieur de l'Union Européenne, toutefois, cette utilisation comme supplément alimentaire a été bannie en 1999 <sup>[175]</sup>

Quatre mécanismes de résistance à la bacitracine ont été décrits jusqu'à présent. Le premier est le mécanisme retrouvé chez *B. licheniformis*, bactérie productrice de bacitracine. Il s'agit d'un transporteur ABC, qui permet d'expulser l'antimicrobien hors de la cellule, et qui est codé par le locus *bcrABC* <sup>[13]</sup>. Il s'agit du mécanisme le plus souvent rencontré chez les bactéries résistantes à la bacitracine. Des homologues de ce transporteur ABC ont été retrouvés chez *B. subtilis* (*bceA* et *B*), *Enterococcus faecalis* (*bcrA* et *B*) et *Escherichia coli* (*bcrC<sub>EC</sub>*) <sup>[14, 176, 177]</sup>. Il a été démontré par Matos *et al.* (2009) que chez *Enterococcus* spp., les gènes *bcrA* et *bcrB* étaient suffisants pour conférer une résistance de haut niveau à la bacitracine (CMI > 256 µg/mL) <sup>[178]</sup>.

Le deuxième mécanisme de résistance à la bacitracine consiste en la synthèse *de novo* du transporteur undécaprényl phosphate, à partir de l'undécaprénol présent dans la membrane, par une undécaprénol kinase surexprimée. Ce mécanisme a été retrouvé chez *E. faecalis* et est codé par le gène *bcrD* <sup>[176]</sup>. Un homologue de ce gène a été retrouvé chez *E. coli* <sup>[179, 180]</sup>. Toutefois, quelques années plus tard, une étude d'El Ghachi *et al.* (2004) a démontré que le gène *bacA* chez *E. coli*, possédait une activité undécaprényl pyrophosphate phosphatase et le gène a donc été renommé *uppP* <sup>[181]</sup>.

La production d'une UPP phosphatase est le troisième mécanisme de résistance à la bacitracine. Cette enzyme, qui est excrétée à l'extérieur de la cellule bactérienne, va compétitionner avec la bacitracine pour la liaison à l'UPP. Suite à la liaison de l'UPP phosphatase à sa cible, il y a déphosphorylation de transporteur membranaire en UP puis récupération à l'intérieur de la bactérie. Cette enzyme a été retrouvée chez *B. subtilis* et est codée par le gène *bcrC* <sup>[14]</sup>. Un homologue de ce gène, *bacA*, a été retrouvé chez *E. coli* (*uppP*), *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* <sup>[182]</sup>.

Le dernier mécanisme de résistance à la bacitracine implique les exopolysaccharides. Chez les bactéries à Gram négatif *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas* sp. et *E. coli*, la résistance est due à un arrêt de la production des exopolysaccharides <sup>[17]</sup>. Comme les voies de biosynthèse des exopolysaccharides et du peptidoglycane utiliseraient le même transporteur, soit l'undécaprényl phosphate (UP), l'arrêt de la production des exopolysaccharides permettrait de détourner les transporteurs utilisés dans cette voie vers la voie de production du peptidoglycane, permettant ainsi la synthèse de la paroi essentielle à la survie de la bactérie. Ce surplus de transporteurs contournerait la séquestration du transporteur à l'extérieur de la cellule par la bacitracine <sup>[17]</sup>. Dans le cas de *Streptococcus mutans*, la production du polysaccharide rhamnose-glucose créerait une barrière qui empêcherait la bacitracine d'atteindre sa cible à la surface de la cellule <sup>[18]</sup>.

Plusieurs études ont permis de démontrer la présence de résistance phénotypique à la bacitracine. Chalmers *et al.* (2008) ont observé que 95 % des isolats de *C. perfringens* provenant de poulets sains étaient résistants à la bacitracine <sup>[183]</sup>. De même, Slavić *et al.* (2011) ont détecté de la résistance dans 64 % et 60 % des isolats provenant de poulets et de dindes, respectivement <sup>[20]</sup>. Toutefois, aucune résistance n'a été observée chez les isolats provenant du porc ou du bovin <sup>[20]</sup>. Aux États-Unis, une étude a permis de démontrer que 88 % des isolats provenant de poulet étaient résistants à la bacitracine alors que cette résistance n'a été détectée que dans 9 % des isolats de dinde <sup>[19]</sup>. Dans l'Union européenne, la résistance phénotypique est plus faible. Aucune résistance n'a été détectée en Belgique et en Norvège alors qu'en Suède et au Danemark, 3 et 15 % des isolats de poulet étaient résistants à la bacitracine, respectivement <sup>[184, 185]</sup>.

#### 1.5.2.2 Virginiamycine

La virginiamycine est un antimicrobien utilisé comme promoteur de croissance ainsi que pour traiter les infections due à *C. perfringens* chez la volaille <sup>[19]</sup>. Toutefois, à l'intérieur de l'Union Européenne, l'utilisation de la virginiamycine comme promoteur de croissance a été bannie en 1999 <sup>[160]</sup>. La virginiamycine est composée de deux molécules qui agissent de façon synergique, soit la virginiamycine

M et S <sup>[160]</sup>. Utilisé individuellement, chaque composant est bactériostatique mais lorsqu'ils sont combinés, ils deviennent bactéricides. La combinaison des deux molécules de virginiamycine agit en se liant à l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome, formant un complexe stable qui inhibe de façon irréversible la synthèse protéique <sup>[160]</sup>. La virginiamycine cible principalement les coques et bacilles à Gram positif mais affecte également quelques bactéries à Gram négatif.

Au niveau génotypique, aucun gène de résistance à la virginiamycin n'a été détecté chez *C. perfringens* à ce jour. Toutefois, plusieurs études ont permis de démontrer la présence d'isolats de *C. perfringens* démontrant une diminution de la sensibilité à la virginiamycine. En effet, Watkins *et al.* (1997) ont observé que les isolats de *C. perfringens* possédaient des CMI pour la virginiamycine entre 2 et 32 µg/mL et que 58.3% des isolats démontraient des CMI  $\geq$  à 8 µg/mL <sup>[19]</sup>. Johansson *et al.* (2004) ont observé, quant à eux, que 13% des isolats provenant de Norvège possédaient des CMI élevées à la virginiamycine alors que de faibles CMI ont été détectées parmi les isolats danois et suédois <sup>[185]</sup>. En Ontario, il a été observé que les isolats de *C. perfringens* possédaient des CMI pour la virginiamycine qui variaient entre 0.5 et 4 µg/mL <sup>[20]</sup>. Présentement, aucune valeur seuil de résistance n'a été établie par le CLSI pour la virginiamycine.

### 1.5.2.3 Tétracyclines

Les tétracyclines sont des agents bactériostatiques qui ont comme mécanisme d'action l'inhibition de la synthèse protéique en prévenant l'association de l'aminoacyl-ARNt au site accepteur situé sur la sous-unité 30S du ribosome. Les tétracyclines sont des antimicrobiens à large spectre actifs contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que contre les mycoplasmes, les chlamydies et les légionelles <sup>[186]</sup>.

Plusieurs gènes de résistance à la tétracycline ont été décrits chez *C. perfringens*. On retrouve les gènes *tetA(P)*, *tetA408(P)*, *tet(K)* et *tet(L)*, retrouvés sur des plasmides, qui codent pour des pompes à efflux <sup>[184, 187, 188]</sup>. Ce mécanisme permet d'expulser les molécules d'antimicrobiens à l'extérieur de la cellule. Le complexe est

composé d'une perméase et d'une ATPase, qui utilise l'ATP comme source d'énergie, permettant le fonctionnement de la pompe. On retrouve également les gènes *tetB(P)* (plasmide) et *tet(M)* (transposon), qui codent pour des molécules impliquées dans la protection du ribosome <sup>[184, 187, 188]</sup>. Ces molécules se lient au ribosome, induisant ainsi un changement de conformation, ce qui empêche la liaison des molécules d'antimicrobiens à sa cible. Présentement, aucune valeur seuil de résistance n'a été établie par le CLSI pour la tétracycline. Toutefois, Chalmers *et al.* (2008) ont observé que 41.4 % des isolats de *C. perfringens* possédaient des CMI élevés pour la tétracycline <sup>[183]</sup>. D'autres études ont également démontré qu'une grande proportion des isolats de *C. perfringens* démontraient une baisse de la sensibilité à la tétracycline <sup>[20, 185, 187]</sup>.

#### 1.5.2.4 Macrolides et lincosamides

Les macrolides et lincosamides sont des agents bactériostatiques qui comprennent, entre autres, la tulathromycine, la tylosine, la tilmicosine, la lincomycine ainsi que la tiamuline. Ces antimicrobiens possèdent plusieurs points communs dont un même mode d'action, l'interférence avec la synthèse protéique, ainsi que des sites d'interaction avec le ribosome se chevauchant. Les molécules se lient à la sous-unité 50S du ribosome et bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en dissociant trop tôt le peptidyl-ARNt du ribosome <sup>[189]</sup>. Les macrolides sont actifs contre les bactéries à Gram positif, quelques bactéries à Gram négatif et les anaérobies, alors que les lincosamides sont actifs contre plusieurs bactéries à Gram positif, les anaérobies et les mycoplasmes <sup>[190]</sup>.

Les gènes de résistance aux macrolides et lincosamides retrouvés chez *C. perfringens* regroupent plusieurs mécanismes. Premièrement, on retrouve les gènes *erm(B)* et *erm(Q)* (plasmides), qui codent pour une méthylase de l'ARNr 23S, qui modifie la cible de l'antimicrobien <sup>[191]</sup>. Ces gènes *erm* sont responsables de la résistance croisée aux macrolides-lincosamides-streptogramines B (MLS<sub>B</sub>) des bactéries les portant. On retrouve également le gène *mef(A)* (transposon), codant pour une pompe à efflux <sup>[192]</sup>. Cette pompe est responsable de la résistance aux macrolides à 14 et 15 carbones <sup>[193]</sup>. Finalement, le dernier groupe de gènes retrouvé contient les

gènes *lnu(A)* et *lnu(B)* (plasmides), qui codent pour une nucléotidyltransférase agissant sur les groupes hydroxyl <sup>[184]</sup>. Dans le cas de la nucléotidyltransférase *Lnu(A)*, celle-ci inactive la lincomycine et la clindamycine en les convertissant en lincomycine 3-(5'-adénylate) et clindamycine 4-(5'-adénylate) en utilisant l'ATP, le GTP, le CTP ou l'UTP comme donneur de groupements nucléotidyl, et le MgCl<sub>2</sub> comme co-facteur <sup>[194]</sup>. Pour ce qui est de *lnu(B)*, ce gène code pour une enzyme catalysant la 3-(5'adénylation) de la lincomycine et de la clindamycine <sup>[195]</sup>. Ces modifications inactivent l'antimicrobien, empêchant ainsi son activité bactériostatique. Présentement, aucune valeur seuil de résistance n'a été établie par le CLSI pour les macrolides et lincosamides. Peu d'isolats ont démontrés une baisse de la sensibilité aux macrolides et lincosamides (entre 0 et 10.2 %) <sup>[20, 183, 185]</sup>.

#### 1.5.2.5 Chloramphénicol

Chez l'humain, l'utilisation du chloramphénicol est associée au développement d'anémie aplasique, une condition rare mais sérieuse résultant de l'arrêt de production de cellules sanguines par la moelle osseuse <sup>[196]</sup>. C'est pourquoi l'utilisation du chloramphénicol a été bannie, au Canada et dans d'autres pays, chez les animaux servant à l'alimentation humaine (Santé Canada, 1997) <sup>[197]</sup>. Malgré l'arrêt de l'utilisation de cet antibiotique, deux gènes de résistance au chloramphénicol ont été détectés chez *C. perfringens*, soit *catP* et *catQ* <sup>[168, 198, 199]</sup>. Ces gènes codent chacun pour une acétyltransférase qui catalyse l'acétylation de la molécule de chloramphénicol. Cette acétylation diminue l'activité de l'antibiotique, soit l'inhibition de l'activité peptidyltransférase au niveau du ribosome <sup>[199]</sup>.

#### 1.5.2.6 $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont des agents bactéricides qui ont comme mécanisme d'action l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. Les  $\beta$ -lactamines sont actives contre les bactéries à Gram positif ainsi que les bactéries à Gram négatif. Chez *C. perfringens*, très peu ou pas de résistance phénotypique envers les  $\beta$ -lactamines ont été décrites <sup>[20, 183, 185, 200-202]</sup>. Kouassi *et al.* (2014) n'ont détecté qu'un isolat sur 20 résistant à la pénicilline et à l'ampicilline alors que Slavić *et al.* (2011)

n'ont détecté que 3 isolats sur 85 avec des CMI entre 2 et 4 µg/mL (le seuil de résistance établi par le CLSI est de  $\geq 2$  µg/mL) <sup>[20, 200]</sup>.

Jusqu'à présent, un seul article porte sur la résistance génotypique associée à la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *C. perfringens*. Catalan *et al.* (2010) ont isolé d'araignées 5 isolats de *C. perfringens* possédant de hauts niveaux de résistance à la pénicilline (CMI entre 64 et  $> 128$  µg/mL) <sup>[203]</sup>. Parmi ces isolats, les auteurs ont détecté le gène *bla*, codant pour une  $\beta$ -lactamase, que dans un seul des isolats. Toutefois, grâce à un test enzymatique, les auteurs ont pu déterminer que tous les isolats résistants produisaient des  $\beta$ -lactamases.

## **2. Biofilm**

### **2.1 Généralités**

Les bactéries possèdent la faculté de croître sur presque toutes les surfaces en formant des communautés à l'architecture complexe mais structurée nommées biofilms. Dans ces biofilms, les bactéries se développent en agrégats multicellulaires et sont entourées d'une matrice extracellulaire produite par ces mêmes bactéries <sup>[22, 204]</sup>. Les biofilms peuvent être retrouvés en milieu naturel, médical et industriel. Malgré leur importance, ce n'est que dans les années 70 que les chercheurs ont commencé à apprécier le fait que les bactéries retrouvées sous forme de biofilms constituaient une portion majeure de la biomasse bactérienne dans plusieurs environnements <sup>[205]</sup>. La formation de biofilm constitue un mode de croissance protégé qui permet la survie dans un environnement hostile. Les structures formées dans les biofilms contiennent des canaux par lesquels les nutriments peuvent circuler. De plus, les cellules bactériennes présentes dans le biofilm possèderaient différents patrons d'expression géniques, variant selon leur position dans le biofilm <sup>[206]</sup>. La complexité de la structure et du métabolisme du biofilm emmène souvent la comparaison du biofilm avec les tissus des organismes supérieurs <sup>[115]</sup>. Afin de créer cette structure, les bactéries utilisent un système de communication intercellulaire appelé le quorum sensing. Ce système permet aux bactéries de reconnaître la densité de population en mesurant la quantité de molécules de signalisation puis de réguler la

transcription de plusieurs gènes. Ces molécules du quorum sensing, appelées autoinducteurs, sont impliquées dans la régulation de la production d'exopolysaccharides ainsi que dans la dispersion du biofilm <sup>[207]</sup>.

La formation de biofilm apporte plusieurs avantages aux bactéries. Le biofilm confère une résistance à plusieurs antimicrobiens, protège contre les protozoaires et les défenses de l'hôte. Une des raisons possibles expliquant l'augmentation de la résistance face aux stress environnementaux des biofilms serait l'augmentation de la proportion de persisteurs à l'intérieur du biofilm. Malgré le fait que les persisteurs sont génétiquement identiques au reste de la population, ces bactéries sont résistantes à plusieurs antimicrobiens et ne se divisent pas <sup>[204]</sup>. En plus de l'augmentation de la proportion de persisteurs, la présence d'une matrice extracellulaire protège les bactéries des agressions externes. Cette matrice agit également comme une barrière de diffusion pour les petites molécules <sup>[208]</sup>. À l'intérieur du biofilm, la diffusion des nutriments, vitamines et cofacteurs est plus lente, menant à une communauté bactérienne où quelques bactéries sont inactives métaboliquement <sup>[204]</sup>.

## **2.2 Modèle de formation du biofilm**

La formation de biofilm comporte plusieurs étapes. Les bactéries doivent d'abord s'attacher à une surface, via des molécules spécifiques présentes à la surface de la bactérie (Figure 2A). Les bactéries approchant très près d'une surface vont s'attacher à celle-ci de façon transitoire. La motilité flagellaire favoriserait ces interactions intimes des bactéries avec la surface en permettant à la bactérie de contrer les forces de répulsion <sup>[209]</sup>. Cette augmentation de l'adhésion par la motilité flagellaire a été démontrée chez plusieurs bactéries dont *Aeromonas*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* <sup>[210-213]</sup>. La présence de pili rétractables a également été démontrée comme étant nécessaire pour l'attachement des bactéries à Gram négatif à une surface <sup>[214-216]</sup>. En effet, ces structures peuvent se rétracter en présence de grandes forces de répulsion, permettant donc aux bactéries de traverser ces forces <sup>[209, 217]</sup>.

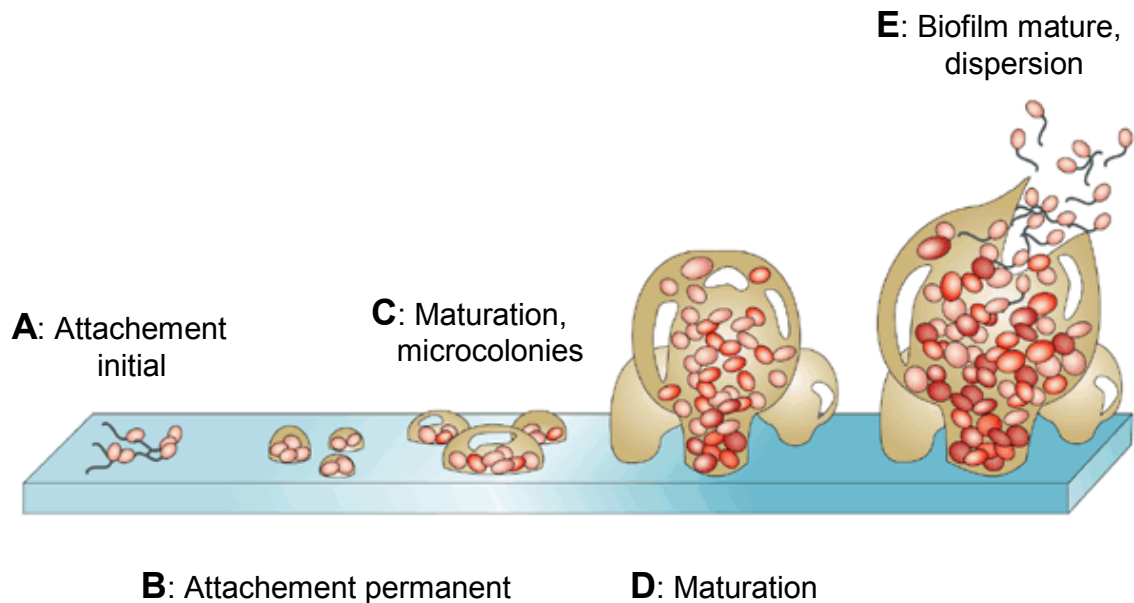


Pendant la phase d'attachement transitoire, quelques bactéries vont rester attachées à la surface pour une longue période de temps, passant à la phase d'attachement permanent <sup>[209]</sup>. Chez *Vibrio cholerae*, des évidences semblent suggérer qu'un changement dans le potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) permettrait la transition de l'attachement transitoire vers l'attachement permanent <sup>[218]</sup>. Plusieurs bactéries vont produire des adhésines pour permettre la stabilisation de l'attachement à la surface. Chez *Pseudomonas fluorescens*, cette stabilisation est médiée par LapA, une adhésine sécrétée qui s'associe avec la surface de la cellule bactérienne <sup>[219, 220]</sup>. D'autres adhésines ont été impliquées dans la transition de l'attachement transitoire vers l'attachement permanent dont SadB, chez *P. aeruginosa*, et PGA chez *E. coli* <sup>[221, 222]</sup>.

Une fois les bactéries attachées à la surface, elles vont s'autoagrèger en microcolonies (Figure 2B et C). En plus des facteurs d'adhésion, d'autres composants de surface sont nécessaires pour l'autoagrégation des bactéries. Chez *P. aeruginosa*, les pili de type IV sont impliqués dans une motilité de surface nommée 'twitching' et celle-ci serait nécessaire pour l'agrégation des bactéries en microcolonies <sup>[221]</sup>. De plus, des études semblent démontrer que durant les phases d'attachement et de formation de microcolonies, il y aurait activation de la transcription de gènes spécifiques. Chez *P. aeruginosa*, des constructions *algC*, *algD*, et *algU::lacZ*, gènes essentiels à la synthèse de l'exopolysaccharide extracellulaire alginate, ont permis de démontrer qu'il y avait activation de la transcription de ces gènes suite à l'attachement de la bactérie à une surface solide. Il semblerait donc que l'attachement de la bactérie pourrait initier la synthèse de la matrice extracellulaire <sup>[22, 223]</sup>.

Suite à la formation de microcolonies, le biofilm commence à prendre forme grâce à la maturation des bactéries attachées (Figure 2D). Durant la maturation, il y a synthèse d'exopolysaccharides qui vont former une matrice entourant et liant la communauté bactérienne. Les bactéries retrouvées en biofilm coordonnent leurs actions ce qui mène à la formation de structures complexes tridimensionnelles qui peuvent être plates ou en forme de champignon, cette variation étant influencée par la source de nutriments et par la présence de force de cisaillement <sup>[224]</sup>. Chez *P.*

*aeruginosa*, la formation d'un biofilm mature nécessite une molécule de signalisation extracellulaire, la 3-oxododecanoylhomosérine lactone [22].



Source : Modifié de Davies (2003) [26]

### Figure 2: Modèle de formation du biofilm.

La formation de biofilm comporte cinq étapes soit A) la phase d'attachement transitoire, B) la phase d'attachement permanent, C) l'autoagrégation en microcolonies, D) la maturation des colonies et E) le détachement et la dispersion des bactéries.

La dernière étape dans la formation du biofilm est le détachement et la dispersion des bactéries, ce qui permet de coloniser de nouvelles surfaces (Figure 2E). Boyd et Chakrabarty (1994) ont suggéré que la dispersion des cellules de *P. aeruginosa* impliquerait l'action de l'alginate lysase, enzyme digérant l'alginate présente dans la matrice d'exopolysaccharides [225]. Il a également été démontré que chez *Rhodobacter sphaeroides*, une acylhomosérine lactone, signal de quorum-sensing, était nécessaire pour la dispersion des cellules du biofilm [226]. La dispersion peut se produire en réponse à des changements environnementaux, que ce soit une carence nutritionnelle ou à un apport soudain en nutriments [227, 228].

## **2.3 Composition de la matrice**

### **2.3.1 Exopolysaccharides**

Les polysaccharides sont une fraction majeure de la matrice du biofilm. La majorité sont de longues molécules, linéaires ou branchées, possédant une masse entre  $0.5 \times 10^6$  à  $2 \times 10^6$  daltons <sup>[229]</sup>. Quelques exopolysaccharides sont des homopolysaccharides, comme le glucane, le fructane et la cellulose, mais la plupart sont des hétéropolysaccharides constitués d'un mélange de sucres neutres et chargés. Une grande partie des exopolysaccharides (EPS), incluant l'alginate, le xanthane et l'acide colanique, sont polyanioniques dû à la présence d'acides uroniques dans leur structure <sup>[229]</sup>. Il existe également des EPS polycationiques, comme l'adhésine intercellulaire retrouvée chez *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* qui est composée de  $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine partiellement déacétylés <sup>[230]</sup>. Les exopolysaccharides peuvent également être diversifiés à l'intérieur d'une même espèce bactérienne. Chez *P. aeruginosa*, trois exopolysaccharides différents sont produits, soit l'alginate, un polysaccharide riche en glucose nommé Pel ainsi que Psl, une molécule composée de répétitions d'un pentasaccharide contenant du D-mannose, du D-glucose et du L-rhamnose <sup>[231]</sup>. Ces trois EPS ont des rôles différents mais sont tous impliqués dans le développement et l'architecture du biofilm <sup>[229]</sup>. Pour plusieurs bactéries, les EPS sont essentiels pour la formation de biofilm. En effet, la mutation de gènes essentiels dans la production des exopolysaccharides compromet ou abolie la production d'un biofilm mature <sup>[232, 233]</sup>. Toutefois, dans le cas des biofilms mixtes, la présence d'une espèce produisant des EPS peut permettre l'intégration à l'intérieur du biofilm d'une seconde espèce, qui elle ne produit pas de polysaccharides <sup>[234]</sup>.

### **2.3.2 Protéines**

La matrice des biofilms contient une quantité importante de protéines qui, lorsque réunies, peuvent dépasser le contenu en exopolysaccharides <sup>[235]</sup>. Plusieurs enzymes extracellulaires ont été détectées dans les biofilms, la majorité étant impliquées dans la dégradation des biopolymères. Les substrats de ces enzymes sont soit des polymères solubles dans l'eau (polysaccharides, protéines et acides

nucléiques), soit des substances insolubles dans l'eau (cellulose, chitine et lipides) ou soit des particules organiques emprisonnées dans le biofilm <sup>[229]</sup>. La présence de ces enzymes dans la matrice permet de digérer les biopolymères en des produits de faibles poids moléculaires qui peuvent, par la suite, être absorbés par les bactéries et utilisés comme sources de carbone et d'énergie. De plus, quelques enzymes peuvent être impliquées dans la dégradation des EPS pour promouvoir le détachement des bactéries du biofilm et d'autres peuvent agir comme facteurs de virulence lors de l'infection. Les enzymes extracellulaires peuvent être retenues efficacement dans la matrice par leur interaction avec les polysaccharides. Cet arrangement permet de garder l'activité enzymatique près des cellules et de diminuer la distance de diffusion des produits enzymatiques, favorisant leur acquisition par les bactéries. De plus, les interactions entre les enzymes et les exopolysaccharides augmentent la thermostabilité des enzymes et leur résistance à la protéolyse <sup>[236]</sup>.

Plusieurs enzymes peuvent dégrader les EPS durant une carence nutritionnelle, que ce soit les EPS produits par la bactérie excréant l'enzyme ou les EPS d'une autre espèce <sup>[237]</sup>. Une des étapes importantes dans le développement des biofilms est la dispersion de cellules sessiles, permettant la formation de nouveaux biofilms. Pour qu'il y ait dispersion, la matrice doit subir des modifications par les enzymes sécrétées par la bactérie <sup>[227]</sup>. Chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anciennement *Actinobacillus*), l'enzyme N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidase, codée par le gène *dspB*, permet le détachement et la dispersion des cellules du biofilm <sup>[238]</sup>. Toutefois, il n'existe aucune enzyme ou mélange d'enzymes capables de dégrader tous les différents polysaccharides présents dans la matrice d'un biofilm.

Les protéines non-enzymatiques, comme les protéines de surface et les lectines, sont impliquées dans la formation et la stabilisation du réseau de polysaccharides, en plus de constituer un lien entre la surface des bactéries et les EPS extracellulaires <sup>[229]</sup>. Chez *P. aeruginosa*, les lectines LecA et LecB ont été impliquées dans la formation de biofilm <sup>[239, 240]</sup>. De plus, lorsque *P. aeruginosa* est incubé en présence d'un ligand synthétique de haute affinité pour LecB, la formation de biofilm est inhibée et il y a dispersion complète du biofilm déjà formé, démontrant l'implication de cette lectine dans la stabilisation du biofilm <sup>[241]</sup>. RbmA, une protéine

sécritée par *Vibrio cholerae* El Tor A1552, est nécessaire pour la rugosité et la résistance du biofilm. En effet, les biofilms formés par un mutant  $\Delta rbmA$  sont rapidement dégradés par un traitement au SDS alors que la souche sauvage peut résister pendant une plus longue période de temps. Des analyses de structure de la protéine RbmA suggèreraient la possibilité d'une liaison avec les polysaccharides de la matrice, augmentant ainsi la force du biofilm <sup>[242]</sup>. Il existe également une autre famille de protéines extracellulaires retrouvées au niveau de la matrice appelé Bap (Biofilm-associated proteins). Il s'agit de protéines de haut poids moléculaire présentes à la surface des cellules et qui favorisent la formation de biofilm chez plusieurs espèces bactériennes <sup>[243]</sup>. Ces protéines contiennent un domaine central composé de répétitions en tandem qui est nécessaire pour la formation du biofilm <sup>[229]</sup>. La majorité de ces protéines seraient soit attachées à la surface de la cellule, soit associées faiblement à la surface cellulaire ou soit sécrétées dans le milieu. Elles serviraient donc à retenir les bactéries ensemble possiblement en interagissant avec des protéines similaires à la surface ou à proximité des cellules voisines <sup>[209]</sup>. Sous certaines conditions, la présence de protéines de la famille Bap semble éliminer la nécessité de la présence d'exopolysaccharides dans la matrice du biofilm. En effet, chez la souche *S. aureus* V329, l'inactivation de l'opéron *icaADBC*, impliqué dans la synthèse et l'export d'EPS, ne semblerait pas diminuer la formation de biofilm lorsque Bap est présent <sup>[244]</sup>. De plus, plusieurs espèces de *Staphylococcus* peuvent produire du biofilm en l'absence de l'opéron *icaADBC* <sup>[245]</sup>. Un autre composant protéique ubiquitaire de la matrice sont les amyloïdes, fibres composées de répétitions de protéines repliées en feuillets  $\beta$ . Ces molécules sont impliquées dans l'adhésion à des surfaces inanimées et dans l'adhésion aux cellules hôtes <sup>[246]</sup>. Ag43, AIDA et TibA, trois glycoprotéines appartenant à la famille des auto-transporteurs auto-associatifs, ont été impliqués dans la formation de biofilm chez des souches de *E. coli* toxigéniques et non-toxigéniques <sup>[247-249]</sup>. Ces protéines serviraient à maintenir des interactions rapprochées entre les cellules du biofilm, augmentant la stabilité de la structure. Les pili, les fimbriae et les flagelles peuvent également intervenir dans la structuration de la matrice en interagissant avec les autres éléments contenus dans le biofilm. Chez *Salmonella* Typhimurium et *E. coli*, la co-production de fimbriae et de cellulose permet la formation d'une matrice extracellulaire rigide, alors que la production de l'un ou l'autre des deux éléments résulte en la formation d'une matrice

fragilisée <sup>[250]</sup>. De plus, chez *E. coli*, des études de profilage transcriptionnel ont démontré que l'expression des gènes codant pour les fimbriae et pili était augmentée lorsque les bactéries étaient en biofilm comparativement à l'état planctonique <sup>[251, 252]</sup>.

### 2.3.3 ADN extracellulaire

Pour ce qui est de l'ADN extracellulaire (ADNe), celui-ci a été retrouvé dans des biofilms de diverses origines mais la quantité d'ADN produit varie, et ce, même entre des espèces très rapprochées <sup>[229]</sup>. Par exemple, chez *S. aureus*, l'ADNe est un composant majeur de la matrice du biofilm alors que chez *S. epidermidis*, il n'est qu'un composant mineur <sup>[253]</sup>. Les acides nucléiques semblent avoir un rôle au niveau de l'agrégation des bactéries. Chez *Rhodovulum spp*, groupe de bactéries s'auto-agrégant, les exopolysaccharides produits contiennent des sucres, des protéines et des acides nucléiques. Lorsque ces agrégats sont mis en présence d'enzymes nucléolytiques, ceux-ci se désagrègent alors que les traitements aux enzymes dégradants les polysaccharides et les protéines n'ont eu aucun effet sur les agrégats (Watanabe *et al.*, 1998, cité par Flemming *et al.* <sup>[229]</sup>). L'ADNe est aussi un composant majeur de la matrice du biofilm formé par *P. aeruginosa*. Chez cette bactérie, l'ADNe agirait comme un connecteur intercellulaire et posséderait un patron en grillage <sup>[254, 255]</sup>. Ce patron en grillage permettrait aux bactéries de se déplacer en utilisant le pilus de type IV, ce dernier pouvant se lier à l'ADN <sup>[254]</sup>. Ceci permettrait également la formation des structures en forme de champignon retrouvées dans les biofilms <sup>[256]</sup>. De plus, l'addition de DNase inhibe la formation et dissocie les biofilms déjà formés par cette même bactérie, démontrant l'importance de l'ADN dans la structure du biofilm <sup>[257]</sup>. L'ADNe posséderait aussi une activité antimicrobienne, causant la lyse en chélatant les cations qui stabilisent les lipopolysaccharides et la membrane externe des bactéries <sup>[258]</sup>. L'origine de l'ADNe semble être différente entre les espèces. Chez la souche de gammaprotéobactérie F8, l'ADN retrouvé au niveau du biofilm possède des similarités mais aussi des différences distinctes avec l'ADN génomique, suggérant que l'ADNe n'est pas simplement relâché par des cellules lysées <sup>[259]</sup>. À l'opposé, dans les biofilms de *P. aeruginosa* et de *Pseudomonas putida*, l'ADNe et l'ADN génomique semblent être identiques <sup>[260]</sup>. Dans ces cas, l'ADN proviendrait de la lyse cellulaire ou de la

sécrétion via des vésicules de la membrane externe<sup>[256]</sup>. Chez *S. epidermidis*, l'ADN serait généré via la lyse d'une sous-population bactérienne et cette ADN relâché favoriserait la formation de biofilm pour le reste de la population bactérienne<sup>[229]</sup>.

### **2.3.4 Autres composants**

Le composant majeur de la matrice des biofilms est l'eau, Sutherland (2001) ayant estimé que la matrice pouvait contenir jusqu'à 97 % d'eau<sup>[229, 234]</sup>. Des lipides peuvent également être retrouvés au niveau de la matrice<sup>[229]</sup>. Des rhamnolipides ont été retrouvés dans la matrice de *P. aeruginosa* et ceux-ci agiraient comme surfactants<sup>[261]</sup>. Ils permettraient la formation initiale de microcolonies, faciliteraient la migration bactérienne au niveau de la surface ainsi que la formation des structures en forme de champignons, préviendraient la colonisation des canaux et joueraient un rôle dans la dispersion du biofilm<sup>[229]</sup>. Chez *Thiobacillus ferrooxidans*, la présence de lipopolysaccharides est essentielle pour l'adhérence de la bactérie à des surfaces en pyrite<sup>[262]</sup>. Les biosurfactants, quant à eux, peuvent posséder des propriétés antimicrobiennes et antifongiques, et seraient importants pour l'attachement et le détachement des bactéries aux gouttes d'huile<sup>[263]</sup>.

## **2.4 Tolérance aux antibiotiques et aux désinfectants**

Un des traits associés aux bactéries en biofilm est leur tolérance accrue aux antibiotiques, aux stress environnementaux ainsi qu'aux désinfectants. Lorsque les bactéries se retrouvent en biofilm, elles deviennent de 10 à 10 000 fois plus résistantes que les cellules planctoniques<sup>[26]</sup>. Il a été démontré par Luppens *et al.* (2002) qu'il fallait augmenter de 600 fois la concentration d'hypochlorite de sodium, qui est considérée comme l'un des agents antibactériens les plus efficaces pour détruire un biofilm formé par *S. aureus*, en comparaison avec une culture planctonique de la même espèce<sup>[264]</sup>. Plusieurs facteurs ont été suggérés pour expliquer cette augmentation de la résistance chez les bactéries en biofilm. Premièrement, les bactéries en biofilm, et surtout celles retrouvées au centre, possèderaient un métabolisme ainsi qu'un taux de croissance réduits ce qui les rendrait moins sensibles aux antibiotiques. La matrice extracellulaire, en plus de

bloquer physiquement le passage des molécules, pourrait absorber ou réagir avec les antimicrobiens et désinfectants, ce qui diminuerait la quantité pouvant affecter les bactéries. Finalement, les bactéries en biofilm seraient physiologiquement différentes des cellules planctoniques et exprimeraient des facteurs de protection, comme les pompes à efflux et les régulons impliqués dans la réponse aux stress <sup>[265-267]</sup>. Le transfert horizontal de gènes entre bactéries participerait également à l'adaptation du biofilm à son environnement. En effet, le transfert de plasmides, de transposons et d'intégrons permettrait aux bactéries d'acquérir des gènes codant pour de nouvelles voies métaboliques, des facteurs de virulence ainsi pour la résistance aux antibiotiques <sup>[268-270]</sup>. Dans l'environnement, les biofilms retrouvés sont composés de plusieurs espèces bactériennes et les interactions entre celles-ci pourraient permettre l'émergence d'un phénotype spécifique aux biofilms. Habimana *et al.* (2010) ont démontré que le pathogène alimentaire *E. coli* O157:H7 formait un biofilm possédant 400 fois plus de biovolume lorsqu'il était cultivé en présence de la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus* que lorsqu'il était cultivé en monoculture <sup>[271]</sup>. D'autres études ont également démontré que les biofilms composés de plusieurs espèces étaient généralement plus résistants à la désinfection que les biofilms ne possédant qu'une seule espèce <sup>[272, 273]</sup>.

## **2.5 Exposition à des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques**

Les données disponibles sur le biofilm exposé à des concentrations sous-inhibitrices (sous-CMI) d'antibiotiques sont contradictoires. Dans des études précédentes, il a été observé que la présence de concentrations sous-CMI d'aminoglycosides et de  $\beta$ -lactamines induisaient la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. epidermidis* <sup>[30, 31]</sup>. Il a également été observé que la présence de cefoxatime à une concentration de 0.5 X la CMI induirait la formation de biofilm ainsi que la production d'exopolysaccharides chez trois isolats de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium <sup>[32]</sup>. Chez des isolats de *S. aureus* avec une résistance intermédiaire à la vancomycine, il a été démontré que des doses sous-CMI de vancomycine induisaient la formation de biofilm sur des surfaces en nylon et en silicone alors que de faibles doses d'oxacilline facilitaient la formation de biofilm sur des surfaces en verre <sup>[33]</sup>. Les bactéries pathogènes étant exposées à des



concentrations sous-inhibitrices chez les patients en thérapie, l'augmentation du biofilm pourrait donc représenter un problème majeur pour l'éradication de l'infection <sup>[274]</sup>. D'un autre côté, il a été démontré que des concentrations de moxifloxacine de 0.03 et 0.06 fois la CMI diminuaient significativement l'adhésion et la formation de biofilm par *Stenotrophomonas maltophilia* <sup>[34]</sup>. Chez *S. epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus*, une plus faible densité cellulaire a été observée dans les biofilms qui se sont formés en présence de concentrations sous-CMI de dicloxicilline <sup>[35]</sup>.

## **2.6 C. perfringens**

Peu d'études ont démontré la formation de biofilm simple par *C. perfringens* <sup>[275-277]</sup>. Varga *et al.* ont été les premiers à démontrer que *C. perfringens* pouvait former du biofilm et que celui-ci était plat avec une épaisseur variant entre 30 et 40  $\mu\text{m}$  <sup>[276]</sup>. Donelli *et al.* (2012) ont également démontré que *C. perfringens* adhère fortement aux surfaces <sup>[275]</sup>. La formation optimale du biofilm dépendrait de la présence de la protéine CcpA ("Catabolite control protein"), régulateur de la réponse à une carence en sucre, ainsi que de la motilité dépendante du pilus de type IV. En effet, les auteurs ont démontré que des mutants *pilC* et *pilT*, gènes codant pour des composants des pili de type IV, avaient perdu leur motilité. De plus, ces mêmes mutants ont démontré une réduction significative du nombre de bactéries ainsi que de la quantité de matrice dans le biofilm. Les auteurs ont également démontré qu'un mutant *ccpA* produisait moins de biofilm que la souche sauvage. La protéine CcpA serait également impliquée dans la régulation du ratio biofilm/cellules planctoniques puisque la souche sauvage avait un ratio plus élevé que le mutant en présence de faibles concentrations de glucose. Toutefois, les deux souches ont favorisé la forme planctonique en présence de fortes concentrations de glucose, ce qui suggérerait une régulation indépendante de *ccpA* dans ces conditions. Les biofilms de *C. perfringens* permettraient de protéger les bactéries contre l'exposition à l'oxygène atmosphérique ainsi qu'au peroxyde d'hydrogène. De plus, suite à une exposition à 20  $\mu\text{g/mL}$  de pénicilline G (27 fois la CMI), les cellules en biofilm démontraient des taux de survie de 5 à 15 fois supérieurs à ceux des cellules planctoniques <sup>[276]</sup>. Ils ont également

démontré que la matrice du biofilm de *C. perfringens* contenait des protéines, dont les pilines de type IV, ainsi que des polysaccharides.

Obana *et al.* (2014) ont démontré que la température régula la morphologie du biofilm formé par *C. perfringens* [278]. En effet, à 37°C, le biofilm formé est adhérent, plat et mince alors qu'à 25°C, le biofilm est non adhérent, visqueux et épais. Les auteurs ont également démontré que cette pellicule était composée de protéines, de l'ADN et probablement des polysaccharides extracellulaires. Ils ont également démontré que la formation du biofilm en pellicule (25°C) nécessitait le régulateur principal de sporulation, Spo0A. En effet, il a été démontré qu'un mutant *spo0A* conservait sa capacité à former un biofilm adhérent mais non le biofilm en pellicule. Ceci suggérerait que la formation d'un biofilm en pellicule serait associée à la sporulation chez *C. perfringens*. Une autre étude démontre également qu'un mutant *sleC*, gène impliqué dans la germination des spores, était affecté dans la formation de biofilm [279]. Le régulateur de toxine, CtrAB, serait également nécessaire pour la formation de la pellicule. De plus, le biofilm en pellicule était augmenté en absence du répresseur global AbrB. Dans le cas du biofilm adhérent, sa formation requerrait la présence du répresseur AbrB ainsi que de la piline (PilA2) [278].

Plusieurs ont étudié également la capacité de *C. perfringens* à former des biofilms mixtes. Il a été démontré que *C. perfringens* pouvait coaggréger fortement avec les bactéries intestinales *Bacteroides fragilis* et *Bifidobacterium adolescentis* ainsi qu'avec la bactérie de la flore buccale *Actinomyces naeslundii* [277]. *C. perfringens* a également été isolé de biofilms mixtes formés à l'intérieur d'endoprothèses biliaires, et ce après 6 jours et 40 jours d'utilisation [280]. Woods *et al.* (2012) ont réussi à former dans un modèle en flux (drip-flow) un biofilm mixte composé de *C. perfringens*, *P. aeruginosa* et de *S. aureus* [281]. Il a été observé aussi que chaque espèce possédait sa niche au sein du biofilm, *C. perfringens* se retrouvant dans les couches les plus profondes où les conditions sont anaérobiques. Dans un modèle mimant le système digestif, *C. perfringens* a été détecté dans le milieu mais a été incapable de former un biofilm sur les parois du système contrairement à deux autres *Clostridium*, soit *C. clostridioforme* et *C. malenominatum* [282].

Aucune étude n'est disponible présentement sur l'implication du quorum sensing dans la formation de biofilm chez *C. perfringens*. Toutefois, chez *C. difficile*, il a été observé que LuxS, impliqué dans la synthèse de l'autoinducteur 2, était important pour la formation de biofilm <sup>[283]</sup>. En effet, un mutant *luxS* n'a pu s'attacher à une surface en verre et former une monocouche de cellules. De plus, chez *C. difficile*, LuxS est également impliquée dans la régulation de toxines <sup>[284, 285]</sup>. Il a également été démontré chez *C. perfringens* que LuxS et le système Agr étaient impliqués dans la production de toxines <sup>[286, 287]</sup>.

### **3. Analyse du transcriptome**

#### **3.1 Généralités**

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des gènes transcrits (ARN messagers ou ARNm) présents chez un organisme dans une situation donnée. Elle repose sur la quantification des ARNm, ce qui permet d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données. Ceci permet donc d'acquérir beaucoup d'information sur les réactions d'un microorganisme dans un environnement donné ou face à une situation particulière. Plusieurs techniques permettent d'étudier le transcriptome, dont le séquençage de l'ARN, les puces à ADN et le PCR quantitatif en temps réel.

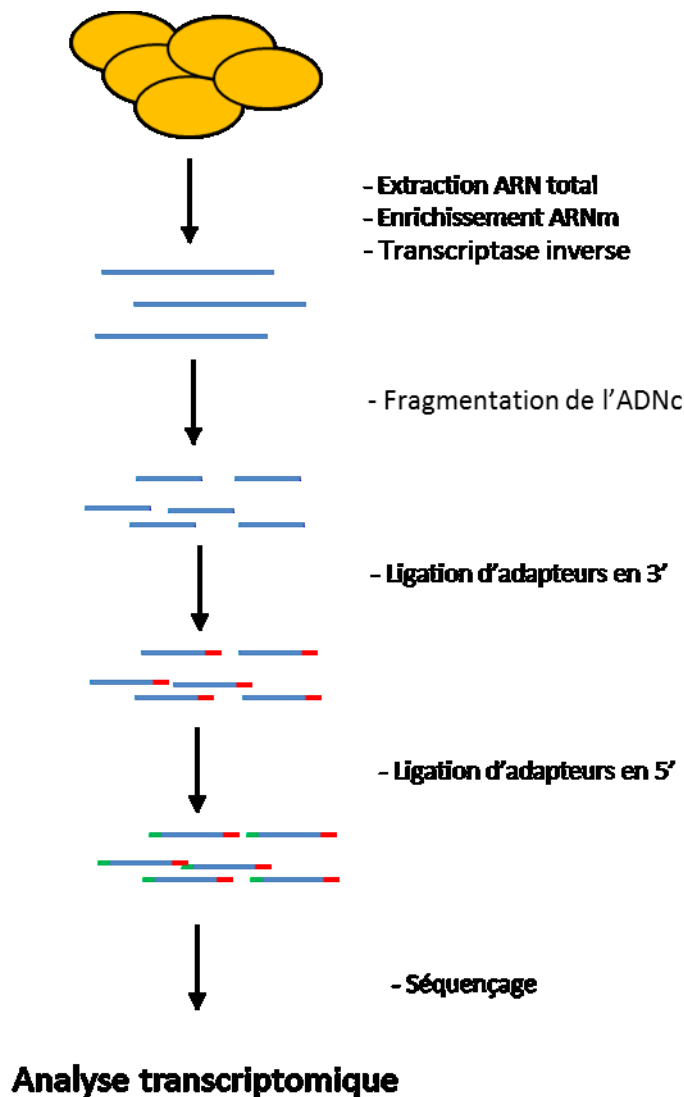
#### **3.2 Étude de l'expression des gènes**

##### **3.2.1 Séquençage de l'ARN**

Avec les nouvelles techniques de séquençage à haut-débit, les méthodes utilisées pour étudier le transcriptome ont récemment évolué <sup>[288]</sup>.

Le séquençage de l'ARN possède plusieurs avantages dont le très faible niveau de bruits de fond, une grande précision dans la quantification des niveaux d'expression, un haut niveau de reproductibilité ainsi que le fait que cette technique n'est pas limitée à la détection de gènes connus <sup>[289]</sup>. Plusieurs technologies de

séquençage à haut débit peuvent être utilisées pour le séquençage de l'ARN, dont les systèmes Illumina, SOLiD, tSMS, PacBio et le 454 [289, 290].



Source : Modifié de Lin *et al.* (2013) [291]

### Figure 3 : Préparation d'une librairie pour le séquençage de l'ARN

L'ARN total est extrait de l'échantillon à l'étude puis convertit en ADNc grâce à la transcriptase inverse. L'ADNc est ensuite fragmentée en petites séquences de taille identique puis celle-ci sont séquencées à partir d'une ou des deux extrémités.

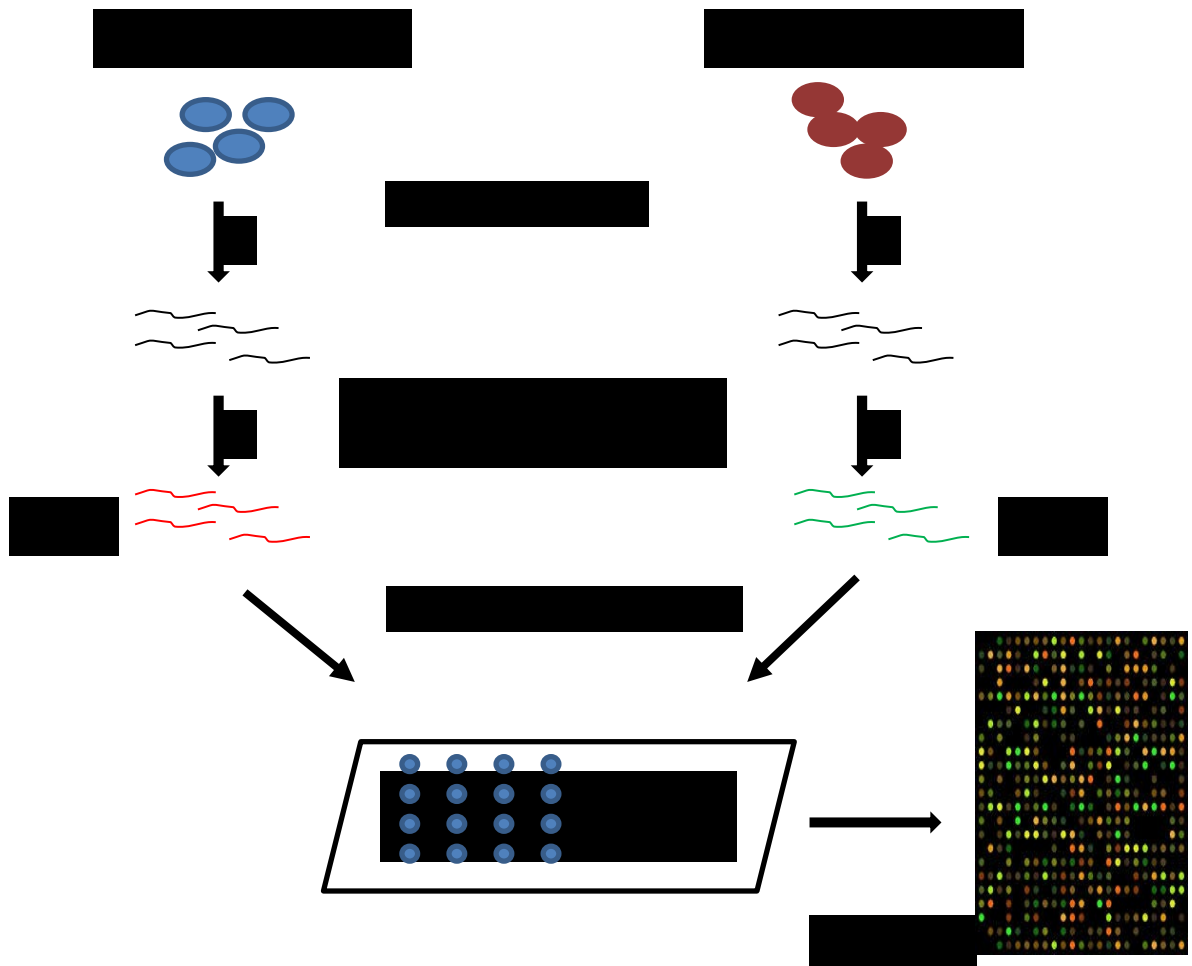
Brièvement, l'ARN total est extrait de l'échantillon à l'étude puis converti en ADN complémentaire (ADNc) grâce à la transcriptase inverse (Figure 3). Comme il

n'est pas possible de séquencer directement toutes les chaînes nucléotidiques d'ADNc en une seule fois du fait de leur longueur, elles sont fragmentées en petites séquences de taille identique appelées *reads*. Chaque molécule est par la suite séquencée à partir d'une ou des deux extrémités. Les séquences obtenues ont une longueur entre 30 et 400 pb, selon la technologie utilisée. Par la suite, les séquences sont alignées avec un génome de référence afin de créer une carte de transcription génomique [289]. Ceci permettra de déterminer l'identité des transcrits ainsi que leur niveau d'expression.

### 3.2.2 Puce à ADN

La puce à ADN, qui a été décrite pour la première fois par Schena *et al.* (1995) [292], est un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Une puce peut contenir  $10^5$  séquences nucléotidiques et même le transcriptome complet [293]. Cette technologie permet d'analyser le niveau d'expression des gènes dans un organisme à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence. La méthode repose sur le principe d'hybridation entre deux séquences complémentaires, donc entre les séquences présentes sur la puce et les ADNc provenant des échantillons.

Pour débiter l'expérience, l'ARN total est extrait de l'échantillon à l'étude puis converti en ADNc grâce à la transcriptase inverse. Avant d'être hybridés sur la puce, les ADNc provenant de l'échantillon contrôle et de l'échantillon expérimental sont marqués différemment grâce à des marqueurs fluorescents (typiquement Cy3 et Cy5). Par la suite, les deux expériences sont co-hybridées sur la puce puis l'intensité de fluorescence des différents fluorophores est détectée pour chaque point (gène ou séquence nucléotidique), ce qui permet de déterminer le niveau d'expression (Figure 4).



**Figure 4 : Analyse transcriptionnelle par puce à ADN.**

L'ARN total est extrait des échantillons puis convertit en ADNc grâce à la transcriptase inverse. Les ADNc provenant du contrôle et de l'échantillon expérimental sont marqués à l'aide des marqueurs fluorescents Cy3 et Cy5. Les deux échantillons sont co-hybridés sur une puce puis l'intensité de fluorescence des différents fluorophores est détectée.

En comparant le niveau d'expression de l'échantillon expérimental et du contrôle, cela permet d'obtenir les gènes différentiellement exprimés dans la situation à l'étude. Cette technique ne peut être toutefois utilisée que si des niveaux suffisants d'ADNc sont utilisés, et ce, pour atteindre une limite de détection acceptable <sup>[294]</sup>. De plus, les puces à ADN, quoique possédant une bonne sensibilité, sont moins sensibles que le PCR quantitatif en temps réel ou le séquençage à haut débit. Toutefois, la puce

à ADN est un outil très utile pour une analyse préliminaire globale de la réponse d'un organisme face à certaines conditions <sup>[293]</sup>.

### **3.2.3 PCR quantitatif en temps réel**

Le PCR quantitatif en temps réel est une méthode d'analyse de l'expression des gènes. Cette technique est plus sensible que la puce à ADN mais demeure moins pratique parce qu'elle ne permet pas d'analyser l'expression d'une grande quantité de gènes simultanément. Cela demeure par contre la méthode de choix pour la validation de l'expression d'un certain nombre de gènes identifiés par puce à ADN ou par séquençage à haut débit <sup>[295]</sup>.

Le PCR en temps réel est basé sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente comme, par exemple, le SYBR-Green. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale d'ADN ou d'ARN <sup>[296]</sup>. Contrairement au PCR conventionnel, les produits de la réaction ne sont pas analysés par électrophorèse, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction de PCR et réduit les risques d'erreurs liés aux manipulations <sup>[295]</sup>.

### **3.3 Étude du biofilm**

Présentement, aucune information n'est disponible sur le transcriptome des *Clostridium* lors de la formation de biofilm. Toutefois, plusieurs études ont analysé le transcriptome du biofilm chez les bactéries à Gram positif. Chez les cellules de *S. aureus* en biofilm, l'expression des gènes codant pour les protéines de liaison, les protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycane et d'autres enzymes impliquées dans la synthèse et le fonctionnement de l'enveloppe cellulaire était significativement plus élevée que chez les cellules planctoniques <sup>[297]</sup>. De plus, les gènes impliqués dans la fermentation du formate, dans l'activité uréase, dans la

réponse au stress oxydatif ainsi que dans la production d'acide et d'ammonium étaient également exprimés de façon plus importante en biofilm. Ces facteurs contribueraient à la survie, à la persistance et à la croissance du biofilm dans l'environnement.

D'un autre côté, il a été observé que les toxines ainsi que les protéases étaient plus faiblement exprimées dans le biofilm comparativement aux cellules planctoniques [297]. Dans le biofilm produit par un autre staphylocoque, *S. epidermidis*, les gènes sous-exprimés sont impliqués dans la production aérobie de l'énergie (passage de la respiration aérobie à la fermentation), dans la traduction ainsi que dans la transcription [298]. Au niveau des gènes plus fortement exprimés, ceux-ci sont impliqués dans les mécanismes de résistance et de défense, ainsi que dans la réponse aux stress. Le fait que les mécanismes de résistance et de défense sont exprimés dans le biofilm suggérerait que l'expression de gènes de *S. epidermidis* serait altérée pour réagir à l'environnement hostile *in vivo* [298]. De plus, dans cette même étude, il a été observé que les gènes impliqués dans la protection osmotique étaient surexprimés.

Dans le cas de *Streptococcus pneumoniae*, les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'isoprénoïde et de la paroi, dans la traduction ainsi que dans les voies de synthèse des purines et pyrimidines étaient exclusivement exprimés dans les étapes précoces de la formation de biofilm alors que les gènes codant pour des régulateurs de transcription étaient exprimés seulement au niveau planctonique [299]. Les auteurs suggèrent que dans les étapes initiales de la formation du biofilm, les cellules seraient activement impliquées dans la synthèse de protéines requises pour l'adaptation à leur nouvel environnement [299]. De plus, Sanchez *et al.* (2011) ont démontré que durant la formation de biofilm, *S. pneumoniae* régulait négativement les gènes impliqués dans la synthèse de protéines, la production d'énergie, le métabolisme, la production de polysaccharides capsulaires ainsi que dans la virulence [300]. Shemesh *et al.* (2007) ont démontré, grâce à des analyses de puces à ADN, qu'environ 12% des gènes de *Streptococcus mutans* étaient différentiellement exprimés en biofilm comparativement aux cellules planctoniques [301]. Les gènes plus fortement exprimés en biofilm sont regroupés en quatre catégories, soit le trafic intracellulaire, les



systemes de transport membranaires, la transcription et le métabolisme de l'énergie. De plus, il a été noté que les gènes impliqués dans la biosynthèse de bactériocines étaient exprimés de façon plus importante dans le biofilm, ce qui permettrait aux cellules de *S. mutans* de persister dans un biofilm oral en inhibant la croissance des autres bactéries <sup>[301]</sup>. La majorité des gènes sous-exprimés étaient impliqués dans la synthèse des protéines. De façon générale, il a été observé que les gènes impliqués dans la synthèse de la membrane ainsi que dans la persistance et la réponse au stress étaient plus fortement induits lors de la formation de biofilm alors que les gènes impliqués dans la transcription, la traduction, la virulence, la production d'énergie et dans le métabolisme étaient moins exprimés dans le biofilm.

#### **4. Problématique, hypothèses et objectifs**

Les problématiques de ce projet de recherche sont que 1) la résistance génotypique à la bacitracine chez *C. perfringens* n'est pas décrite, 2) la formation de biofilm par des souches de *C. perfringens* d'origine aviaire et porcine est inconnue ainsi que sa tolérance aux antibiotiques et aux désinfectants; et 3) le transcriptome lors de la formation de biofilm chez *C. perfringens* n'a pas encore été analysé.

Diverses hypothèses ont été élaborées en lien avec les problématiques du projet : 1) une pompe à efflux d'origine plasmidique explique la résistance phénotypique à la bacitracine chez *C. perfringens* comme observé chez *E. faecalis* <sup>[176]</sup>, 2) la formation de biofilm par *C. perfringens in vitro* est augmentée en présence de concentration sous-inhibitrice de bacitracine comme observé chez plusieurs bactéries <sup>[30, 31, 33]</sup> et 3) le transcriptome des cellules planctoniques diffère de celui des bactéries en biofilm.

Voici, en résumé, les objectifs spécifiques du présent projet de doctorat :

- 1) Identifier les éléments génétiques responsables de la résistance à la bacitracine chez *C. perfringens*.

- Dans une étude préliminaire effectuée dans le laboratoire, des isolats aviaires de *C. perfringens* ont été analysés pour leur résistance à la bacitracine. Les isolats possédant une résistance de haut niveau à la bacitracine (> 256 µg/mL) ont été par la suite analysés par PCR pour détecter les gènes *bcrABDR*, responsable de la résistance chez *E. faecalis* <sup>[176]</sup>. Les gènes *bcrABDR* détectés chez *C. perfringens* seront séquencés par marche sur l'ADN ("primer walking") à partir de la souche *C. perfringens* c1261\_A. Les isolats résistants seront également incubés en présence d'inhibiteurs de pompe à efflux afin de confirmer l'implication d'une pompe à efflux dans la résistance à la bacitracine. Par la suite, les gènes *bcr* seront localisés, ce qui permettra de déterminer si ceux-ci sont sur un plasmide ou sur le chromosome. Leur transcription sera étudiée, en présence ou non de bacitracine, afin de déterminer si la présence de l'antibiotique peut induire la transcription des gènes *bcr*. L'analyse de la transcription permettra également de déterminer si les gènes sont co-transcrits, ce qui indiquerait qu'ils font partie d'un opéron.

## 2) Étudier la formation de biofilm chez *C. perfringens*.

- Pour débiter, un modèle de formation de biofilm sera élaboré et optimisé pour *C. perfringens*. Par la suite, une banque d'isolats commensaux et cliniques de différentes espèces animales sera évaluée pour comparer les taux de formation de biofilm de ces divers isolats. Le rôle du biofilm dans la tolérance à la bacitracine et à d'autres antibiotiques ainsi qu'à l'oxygène sera également évalué. L'effet de concentrations sous-inhibitrices de divers antibiotiques sur la formation de biofilm sera analysé. La résistance des bactéries en biofilm face aux désinfectants sera également analysée. Finalement, la composition de la matrice du biofilm formé par *C. perfringens* sera étudiée par méthode enzymatique et par microscopie confocale.

## 3) Étude transcriptomique de *C. perfringens* en cultures planctoniques et en biofilm.

- Afin de mieux caractériser le biofilm, une étude transcriptomique sera effectuée à l'aide du séquençage de l'ARN par la technologie Illumina. Trois

différentes conditions seront comparées, soit les cellules bactériennes retrouvées dans le biofilm, les cellules planctoniques retrouvées dans le surnageant du biofilm ainsi que les cellules planctoniques retrouvées dans une culture en phase stationnaire.

### **III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

Article 1

**“Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*”**

Audrey Charlebois<sup>1</sup>, Louis-Alexandre Jalbert<sup>1</sup>, Josée Harel<sup>1</sup>, Luke Masson<sup>2</sup> and Marie Archambault<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Department of pathology and microbiology, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), University of Montreal, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada; <sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2

\*Corresponding author: Mailing address: Faculty of Veterinary Medicine, Department of pathology and microbiology, University of Montreal, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada. Phone: 1-450-773-8521 ext 8679; Fax: 1-450-778-8108;

Running title: Bacitracin resistance genes in *Clostridium perfringens*

Publié dans : PLoS ONE, 2012. 7(9): e44449.

Détail sur le rôle de la candidate dans la conception de l'article : J'ai effectué toutes les manipulations à l'exception de l'échantillonnage, du séquençage des gènes *bcr* ainsi que des calculs statistiques. J'ai substantiellement rédigé et révisé l'article dans son ensemble pour la publication.

## Abstract

Phenotypic bacitracin resistance has been reported in *Clostridium perfringens*. However, the genes responsible for the resistance have not yet been characterized. Ninety-nine *C. perfringens* isolates recovered from broilers and turkeys were tested for phenotypic bacitracin resistance. Bacitracin MIC<sub>90</sub> (> 256 µg/mL) was identical for both turkey and chicken isolates; whereas MIC<sub>50</sub> was higher in turkey isolates (6 µg/mL) than in chicken isolates (3 µg/mL). Twenty-four of the 99 isolates showed high-level bacitracin resistance (MIC breakpoint > 256 µg/mL) and the genes encoding for this resistance were characterized in *C. perfringens* c1261\_A strain using primer walking. Sequence analysis and percentages of amino acid identity revealed putative genes encoding for both an ABC transporter and an overproduced undecaprenol kinase in *C. perfringens* c1261\_A strain. These two mechanisms were shown to be both encoded by the putative *bcrABD* operon under the control of a regulatory gene, *bcrR*. Efflux pump inhibitor thioridazine was shown to increase significantly the susceptibility of strain c1261\_A to bacitracin. Upstream and downstream from the *bcr* cluster was an *IS1216*-like element, which may play a role in the dissemination of this resistance determinant. Pulsed-field gel electrophoresis with prior double digestion with I-CeuI/ MluI enzymes followed by hybridization analyses revealed that the bacitracin resistance genes *bcrABDR* were located on the chromosome. Semi-quantitative RT-PCR demonstrated that this gene cluster is expressed under bacitracin stress. Microarray analysis revealed the presence of these genes in all bacitracin resistant strains. This study reports the discovery of genes encoding for a putative ABC transporter and an overproduced undecaprenol kinase associated with high-level bacitracin resistance in *C. perfringens* isolates from turkeys and broiler chickens.

## Introduction

*Clostridium perfringens* is a Gram-positive, anaerobic spore-forming bacterium that causes a wide variety of diseases in humans and animals. A classification based on the production of four major toxins (alpha, beta, epsilon, and iota) divides the *C. perfringens* into five toxigenic biotypes (A to E) [1]. This microorganism is a commensal of the gastrointestinal tract of mammals. It is also commonly found in soil and water [2]. *C. perfringens* is responsible for gas gangrene, enteritis necroticans, food poisoning, and non-foodborne gastrointestinal infections in humans [3]. It is also associated with a variety of enteric diseases in many animal species [4]. Isolates of animal origin constitute a risk for transmission to humans through the food chain. *C. perfringens* has particular significance in poultry where it may cause necrotic enteritis [5]. The disease cost to the international poultry industry has been estimated to be above \$US2 billion per year [6].

Necrotic enteritis is usually controlled by the addition of bacitracin antimicrobial, a polypeptide antibiotic synthesized by *Bacillus licheniformis* and some strains of *Bacillus subtilis*, in feed. It inhibits cell wall synthesis by binding to undecaprenyl pyrophosphate (UPP) and preventing its dephosphorylation, thereby blocking the recycling of UPP to undecaprenol monophosphate (UP also known as C<sub>55</sub>-P transporter), a lipid carrier implicated in the transport of peptidoglycan monomer units through the cytoplasmic membrane [7,8]. In humans, bacitracin is currently used topically in therapy and has been proposed and tested as an oral drug for the control of vancomycin-resistant enterococci with limited success [9]. This antibiotic is nephrotoxic when administered systemically [10]. However, oral therapy is reported to be safer as the drug is not significantly absorbed by the gastrointestinal tract [11]. In animals, bacitracin is largely used in therapy and for prophylaxis purposes. Although banned in Europe as a growth promoter since 1999, bacitracin is still used as a feed additive in some countries namely, Canada, New Zealand and the United States [12,13,14].

To date, four major bacitracin resistance mechanisms have been described. The *bacA* gene encodes for an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) and was discovered in 1992 in *Escherichia coli* [15] and renamed *uppP* in 2004 [16]. This enzyme generates UP from UPP [16]. Homologues to UppP have been described in *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* V583 [17]. The *bcrABC* genes were identified in 1995 in *Bacillus licheniformis* [18]. These genes encode for an ABC transporter that pumps the bacitracin molecule out of the bacterial cell. Homologues to this transporter have been found in *B. subtilis*, *Streptococcus mutans* and *E. faecalis* [19]. Another mechanism is the overproduction of an undecaprenol kinase which converts undecaprenol to UP, increasing the amount of lipid carrier in the bacterial cell [20]. The *bcrD* gene of *E. faecalis* identified by Manson *et al.* [21] encodes for an undecaprenol kinase. It was found to have significant sequence identity to a putative undecaprenol kinase in *Clostridium thermocellum*. The last mechanism involves exopolysaccharide molecules. In *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas* strains S-88 and NW11, and *E. coli* K-12 [22,23] different mutations that inhibit the synthesis of exopolysaccharides have been associated with bacitracin resistance. It is believed that the synthesis of these non-essential polymers also requires the UP transporter, and these mutations therefore indirectly provide an increased supply of this transporter for the synthesis of the essential cell wall component, the peptidoglycan [16]. For *S. mutans*, it is speculated that rhamnose-glucose polysaccharide may act as a barrier that prevents some antibiotics from reaching their targets [24].

In *E. faecalis*, an ABC transporter and an overproduced undecaprenol kinase were both reported to be encoded by the *bcrABD* operon under the control of a regulator, *bcrR* [21]. This regulator has been described as a membrane bound sensor and a transducer of bacitracin availability to regulate *bcrABD* expression [21]. This gene cluster was reported to be located on a transferable plasmid [21]. In *E. faecalis*, these genes have been associated with high-level bacitracin resistance with a minimum inhibitory concentration (MIC) > 256mg/L [25]. It was recently found that the BcrAB transporter was sufficient to confer high-level bacitracin resistance in *E. faecalis* [25].



Despite studies on bacitracin resistance in *C. perfringens* in North America which show high levels of resistance [26,27,28], the genes responsible for the resistance have not yet been identified. In this study, we report the discovery of putative genes encoding for an ABC transporter, an overproduced undecaprenol kinase and a regulatory protein associated with high-level bacitracin resistance in *C. perfringens* isolates from turkeys and broiler chickens. We also demonstrate that *bcrABDR* genes are located on the chromosome.

## **Materials and methods**

### **Ethics Statement**

The handling of animals of this study was performed in accordance with current national Canadian legislation (Meat Inspection and Health of Animals Acts of Canada No. SOR/90-288) under the enforcement of the Canadian Food Inspection Agency (CFIA) inspectors. All fecal samples of this study were taken from already slaughtered animals in federally registered slaughter facilities where federal measures are in place to protect food animals during handling and slaughter.

### **Bacterial isolates**

Isolates of *C. perfringens* from conventionally raised birds were recovered from the normal intestinal microbiota of chicken and turkey taken at five (four chicken and one turkey) processing plants (Berthierville, Saint-Damase I and II, Saint-Anselme, and Saint-Jean-Baptiste) located in the province of Quebec, Canada. Only three isolates were associated with necrotic enteritis. Antimicrobial regimens were not available. The contents of the caeca were cultured in cooked meat broth (PML, Québec, Canada) for 48 h in anaerobic conditions at 35°C. Ten µL were then plated on anaerobic sheep blood agar (PML) and incubated for 24 h under anaerobic conditions. Three greyish colonies with a typical double zone of hemolysis were subcultured for purity on blood agar. Gram staining was performed on every isolate and cultures with Gram-positive square-ended rods were selected for PCR identification and genotyping. One to two *C. perfringens* isolates per bird were kept for this study.

### **PCR identification and genotyping**

A multiplex PCR was used for the detection of the toxin genes *cpa* (alpha), *cpb* (beta), *etx* (epsilon), *iA* (iota), *cpb2* (β2- toxin) and *cpe* (enterotoxin) of *C. perfringens*. Primers and conditions used were as previously described [29] with slight modifications to allow smaller sample and reaction volumes. DNA extraction was performed with the Chelex 100 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) ebullition method where many loops of pure colonies of the isolates were mixed with 10 % Chelex then boiled for 20 min [30]. The supernatant contains the DNA used for

the multiplex PCR. Each PCR reaction was constituted of: 2.5  $\mu$ L of 10 X PCR Buffer (Ge Healthcare, Québec, Canada), 1.5 U of Taq DNA polymerase (Ge Healthcare) and primer sets for *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe*, and *cpb2*. DNA amplification reactions were carried out using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Québec, Canada) programmed as follows: 35 cycles of 20 sec at 94°C, 20 sec at 55°C and 40 sec at 72°C with a hot start of 5 min at 94°C and a final elongation time of 5 min at 72°C. For visualization, 5  $\mu$ L of the PCR reaction were subjected to electrophoresis in 1 % agarose gel stained with ethidium bromide. A 100 bp ladder (TrackIt, Invitrogen, Ontario, Canada) was used as a marker. *C. perfringens* type E (AHL#155, positive for *cpa*, *iA*, *cpe* and *cpb2* genes) and *C. perfringens* type B (AHL#156, positive for *cpa*, *cpb* and *etx* genes) [28] were used as positive controls.

#### **Multiple-locus variable number of tandem repeats analysis**

Multiple-locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) was performed as previously described by Chalmers *et al.* [31] on all bacitracin resistant strains. The PCR products were analysed in 2 % agarose gel stained with ethidium bromide. A TrackIt 100 bp ladder (Invitrogen) was used as a marker. MLVA profiles, created from the number of repeats for each of the VNTR loci, were imported to the BioNumerics software (Applied Maths, Texas, USA). The unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) was used for clustering. Band position tolerance and optimisation were set to 1 %. Identity cut-off was set at 97 %.

#### **Bacitracin susceptibility testing**

Bacitracin minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Preliminary tests indicated that an inoculum size of  $10^5$  CFU/mL allowed the growth of a lawn of well-developed colonies and an easily permitted discernment of growth inhibition by bacitracin. Consequently, an inoculum of  $10^5$  CFU/mL was used for evaluation of bacitracin susceptibilities. Stock cultures were thawed then plated on blood agar plates and incubated for 24 h in anaerobic conditions. Colonies were randomly selected, combined and then diluted in Brucella broth to yield concentrations of  $10^5$  CFU/mL. *C. perfringens* suspensions were spread with a cotton

swab on a Brucella blood agar plate. After the surface of the inoculated plate had completely dried, a bacitracin Etest strip was placed on the surface according to the manufacturer's instructions. Agar plates were then incubated at 35°C in anaerobic conditions for 48 h with a first reading at 24 h and a second reading at 48 h. At both times, colonies could be detected and MICs were read by determining where the zone of growth inhibition intersected the MIC scale on the strip. *S. aureus* ATCC 29213 and *C. perfringens* ATCC 3110 were used as quality controls. The concentrations that inhibited growth of at least 50 % and 90 % of the isolates tested were calculated as MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, respectively. Low level bacitracin resistance breakpoint was set at > 16 µg/mL while high-level bacitracin resistance was set at > 256 ug/mL according to previous studies [21,31].

#### **Detection of bacitracin resistance genes and sequencing**

Sequencing of the *bcr* operon was performed on a bacitracin resistant *C. perfringens* strain c1261\_A isolated from the normal flora of a turkey caecum using the primer walking technique. Primers for the *bcrR* and *bcrB* genes (see Table S1 in the supplemental material) were both designed based on the *E. faecalis* sequences of these genes [21]. Both *bcrR* and *bcrB* genes were detected by PCR in *C. perfringens* strain c\_1261A. Amplicons were purified by Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Mississauga, Canada), sequenced on an ABI PRISM 310 (Applied Biosystems), and results were used for primer walking. Briefly, the targeted sequences were further divided in different section for which primer pairs were designed for PCR and sequencing (Table S1). Each section was amplified using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Québec, Canada) programmed as follows: 35 cycles of 10 sec at 94°C, 10 sec at 50°C and 30 sec at 72°C with a hot start of 5 min at 94°C and a final elongation time of 5 min at 72°C. Each amplicon was purified and sequenced. Sequence alignment was performed using BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences) and sequence analysis was done with the BLASTN and BLASTP programs (National Center for Biotechnology Information, Los Alamos, New Mexico). GeneMark.hmm software was used to locate the gene boundaries [32]. New primers for *bcrA*, *bcrB*, *bcrD* and *bcrR* were designed based on the novel sequences. Bacitracin resistant *C. perfringens* isolates were tested by PCR for the

presence of these genes. The PCR mixture contained 1 X PCR buffer, 200  $\mu$ M of dNTPs, 320 nM of each primer (Table S1), 1 unit of Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Ontario, Canada), and 5  $\mu$ L of the DNA template in a total volume of 25  $\mu$ L. The conditions were: 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C with a hot start of 1 min at 94°C and a final elongation time of 1 min at 72°C. A volume of 10  $\mu$ L of each PCR product was separated for 25 min at 150 V on a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide. To positively correlate the absence of a complete *bcr* locus with phenotypic susceptibility to bacitracin, 70 susceptible *C. perfringens* strains of this study were analyzed for the presence or absence of *bcrABDR* genes. This screening was performed on 70 of the 75 susceptible isolates collected in this study because five of those were not able to grow on subculture for this experiment.

### **Microarray**

Total genomic DNA extracted from bacitracin resistant isolates were analyzed by a custom DNA microarray as previously described [33], with a few modifications. Briefly, we have previously designed and validated antimicrobial resistance microarrays for use with both Gram-negative and Gram-positive bacteria [34,35,36] using a 70-mer probe length to maximize the overall sensitivity of the microarray [37]. A total of 173 probes were used, including 166 antimicrobial resistance genes and a class 1 integron. Sixty-five oligonucleotide probes printed on the microarray were selected directly from a previous study [38]. This array was supplemented with new probes [39,40] found in Table S2 in the supplemental material. DNA was labelled using the Bioprime DNA labeling system (Invitrogen) and purified using PureLink PCR purification kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Labelled DNA was then hybridized on the antimicrobial resistance microarrays which were then scanned by a scanarray express microarray scanner (Packard Biosciences, Billerica, MA, USA). Bacitracin susceptible *C. perfringens* ATCC 13124 was used as a control.

### **Efflux pump inhibitors**

The effect of (ABC) efflux pump inhibitors on bacitracin susceptibility was evaluated by a checkerboard microdilution technique as previously described by Hendricks *et al.* [41]. Inhibitors tested were thioridazine, prochlorperazine, reserpine, verapamil, MK-571, and probenecid (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Combinations of concentrations of inhibitors (0-2048 µg/mL) and bacitracin (0-512 µg/mL) were added to the plates in order to investigate the influence of the tested inhibitors on the MIC values against resistant strain c1261\_A. Three independent checkerboard assays were performed.

### **Plasmid analysis**

Plasmid DNA of the bacitracin resistant *C. perfringens* strain c1261\_A was purified by an alkaline lysis method using a plasmid midi-kit (Qiagen) with the addition of 5 µg/mL of lysozyme in the resuspension buffer before incubation at 35°C for 30 min. The plasmid DNA was visualized on a 1 % agarose gel after an electrophoresis of 60 min at 100 V. The plasmid bands sizes were determined using the software 1Dscan EX 3.01 (BD Biosciences BioImaging) of the Gel Doc 2000 (Bio Rad) by reference to plasmids of known band sizes (Bac-Tracker Supercoiled DNA ladder, Epicentre Biotechnologies). Plasmid curing experiments were also performed as previously described [42] using mitomycin C or the combination of acridine orange and elevated temperature.

### **PFGE analysis**

All genomic DNAs were prepared as described previously [43]. DNA plugs were double-digested with 40 U of I-CeuI (New England Biolabs) and 80 U of MluI (New England Biolabs) for 1 h at 37°C. The I-CeuI restriction enzyme cuts only in the 23S rRNA genes (*rrn* genes), which are localized only on the chromosome. Thus, chromosomal fragments can be distinguished from plasmid bands with the *rrn* probe. DNA fragments were then separated by contour-clamped homogenous electric field (CHEF) electrophoresis with the following conditions: migration of 16 h at 15°C in a 0.8 % agarose gel, with a voltage of 6 V/cm and switch times of 0.5 to 40 sec. A low range PFG marker (New England Biolabs) was used as a DNA ladder. Gels were

stained with ethidium bromide and bands were visualized with the software 1Dscan EX 3.01 (BD Biosciences BioImaging) of the Gel Doc 2000 (Bio Rad).

### **Southern hybridization analysis**

The PFGE genomic DNAs and plasmid extractions were transferred to positively charged nylon membranes (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) using a Vacuum Blotter Model 785 (Bio-Rad). Amplicons derived from the *bcrB* and *rrn* genes were used as hybridization probes. The PCR products were labelled with digoxigenin using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics) and were detected with the DIG nucleic acid detection kit (Roche Diagnostics), both according to the manufacturer's instructions.

### **RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR**

Total *C. perfringens* c1261\_A RNA was extracted with the RNeasy mini kit (Qiagen) from 1 mL of an overnight BHI culture supplemented with 0, 10, 50, 100 or 256 µg/mL of bacitracin. RNA was quantified and stored -80°C. Two µg of RNA was converted to cDNA using the Quantitect reverse transcriptase kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. PCR for the genes *bcrA*, *bcrB*, *bcrD* and *bcrR* were done on the same amount of cDNA from each condition. 23S rRNA gene (*rrn*) was used as a control. PCR products were separated in 1 % agarose gel and stained with ethidium bromide. Also, RT-PCR was used to amplify the intergenic spaces between *bcr* genes to determine whether these genes are cotranscribed.

### **Nucleotide sequence accession number**

Sequences of the *bcrD*, *bcrB*, *bcrA* and *bcrR* genes from *C. perfringens* were deposited in GenBank database under accession numbers GU810179, GU810180, GU810181 and GU810182, respectively.

## Results

### *C. perfringens* genotyping

Ninety-nine field isolates of *C. perfringens* were recovered from the caeca of 50 turkeys (81 isolates) and 13 chickens (18 isolates). Isolation rates of *C. perfringens* from caeca samples were 66 % for turkeys and 30 % for broilers. Of those 99 field isolates, genotyping results revealed that 96 were of type A (alpha toxin) and 3 were of type E (alpha and iota toxins). The three isolates associated with necrotic enteritis were of type A.

### Phenotypic bacitracin resistance

Of the 99 field isolates of *C. perfringens*, 24 of those showed bacitracin resistance (19 and 5 of turkey and chicken origin, respectively). The remaining 75 isolates were susceptible to bacitracin with MICs ranging from 0.75 µg/mL to 16 µg/mL (Table 1). The 24 resistant isolates demonstrated high-level bacitracin resistance by their elevated MIC results (> 256 µg/mL). Percentages of *C. perfringens* isolates from chicken and turkeys that showed bacitracin resistance were 28 % and 23.5 %, respectively. MIC<sub>90</sub> was calculated at > 256 µg/mL for both poultry species. MIC<sub>50</sub> was calculated at 6 µg/mL for turkey isolates and at 3 µg/mL for chicken isolates.

### MLVA analysis

Bacitracin resistant strains ( $n = 24$ ) were analyzed for their genetic relatedness using MLVA. The BioNumerics dendrogram yielded a total of 15 MLVA types for the 24 isolates. These types were separated in three clonal clusters, the first one containing the majority of the isolates ( $n = 16$ ) (Fig. S1). The first cluster also contained all chicken isolates. Among the strains tested, there were 7 pairs of strains each one isolated from the same bird. Of those, only two had over 97 % homology.

### Sequence analysis

The high-level bacitracin resistant *C. perfringens* strain c1261\_A with a MIC of > 256 µg/mL and isolated from the caecum of a turkey was selected for sequencing analysis. Putative bacitracin resistance genes of this strain were sequenced using



PCR amplification with walking primers that were designed based on the sequence of the *E. faecalis* *bcrABDR* operon. Analysis of the sequence data showed that the putative bacitracin resistance genes were contiguous on a DNA fragment of 4486 bp with four open reading frames (ORFs) that were oriented in the same direction and were designated *bcrR* (621 bp), *bcrA* (702 bp), *bcrB* (528 bp), and *bcrD* (654 bp) based on sequence identity with bacitracin resistance genes identified in *E. faecalis* [21] (Fig. 1). Using BLASTN, the complete DNA fragment of the *bcrABDR* genes of *C. perfringens* strain c1261\_A showed 88 % sequence identity to the *bcrABDR* genes previously described in *E. faecalis* plasmid pJM01 [21]. Upstream and downstream sequences (600 bp and 750 bp, respectively) exhibited high sequence identity (99 %) to IS1216-like transposase gene of *E. faecalis* (Fig. 1).

The *bcrD* gene encodes for a putative 218 amino acid protein with an estimated molecular weight of 24 kDa. The amino acid sequence of BcrD was found to have 91 % identity and 96 % similarity to the BcrD protein in *E. faecalis* which is a putative undecaprenol kinase implicated in bacitracin resistance [44,45]. Identities between 60 % and 75 % with undecaprenol pyrophosphate phosphatase of *Eubacterium ventriosum*, *Coprococcus eutactus*, and *Clostridium thermocellum* were also found for the BcrD protein of *C. perfringens* c1261\_A. BcrB, a 176 amino acid putative protein with an estimated molecular weight of 19.8 kDa, shared 84 % identity and 88 % similarity to the *E. faecalis* BcrB protein with a membrane-spanning domain. BcrB also showed identity (between 35 % and 40 %) to a number of permeases associated with ABC transporters. BcrA is a 234 amino acid putative protein with an estimated molecular weight of 26.4 kDa. It has 62 % identity and 72 % similarity to the *E. faecalis* BcrA protein with an ATP-binding domain and also showed identity (between 40 % and 45 %) to other ATP binding proteins of ABC transporters. The complete amino acid sequences of BcrA and BcrB are predicted to be an homodimeric ABC transporter similar to the one recently described by Manson *et al.* (2004). The complete 207 amino acid sequence of BcrR contained a xenobiotic response element (XRE) conserved domain of the transcriptional regulators family from residue 2 to residue 55. BcrR shared 69 % identity and 80 % similarity to *E.*

*faecalis* BcrR which is suspected to act as a sensor and a transducer of bacitracin availability [21]. Its molecular weight was estimated to be 23.6 kDa.

### **PCR and Microarray**

All 24 bacitracin resistant isolates were positive for the four *bcr* genes (*bcrABDR*) on both PCRs and microarrays. They were all also positive for *tetA(P)*, which mediates active tetracycline efflux [46]; and for *tetB(P)*, which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants [46]. Only one isolate was positive for the *erm(B)* gene that encodes a ribosomal methylase that mediates MLS<sub>B</sub> (macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance [47]. *C. perfringens* ATCC 13124 was negative for all the DNA probes. Plasmid curing experiments revealed the loss of the *tet* genes by PCR, indicating plasmid localization of the *tet* genes. However, in no cases, the bacitracin resistance genes proved to be curable. Also, to positively correlate the absence of a complete *bcr* locus with phenotypic susceptibility to bacitracin, 70 susceptible *C. perfringens* strains of this study were analyzed for the presence of *bcrABDR* genes and all strains were negative for all *bcr* genes.

### **Efflux pump inhibitors**

Of all efflux pump inhibitors tested, only thioridazine increased significantly the susceptibility of strain c1261\_A to bacitracin (Table 2). The MIC of this strain moved from 512 µg/mL to 8 µg/mL with increasing concentrations of thioridazine which resulted in a bacitracin susceptible phenotype. The MIC was only slightly reduced with MK-571 (512 to 128 µg/mL), verapamil (512 to 128 µg/mL), prochlorperazine (512 to 256 µg/mL) and reserpine (512 to 256 µg/mL). Probenecid did not show any influence on the MIC of strain c1261\_A (512 µg/mL throughout the experiments). The same results were obtained in all three independent checkerboard assays.

### **Semi-quantitative RT-PCR and amplification of the intergenic spaces between *bcr* genes**

To investigate the expression of *bcrABDR* gene cluster in presence of bacitracin, mRNA levels were analysed by semi-quantitative RT-PCR. Data showed negligible

or no *bcrABD* mRNA in absence of bacitracin (Fig. 2A). When bacitracin was present in the growth medium, the levels of the *bcrABD* transcripts increased as the concentration of bacitracin in which the cells were grown increased. For the *bcrR* gene, the analysis showed that it was expressed constitutively. Also, RT-PCR was used to amplify the intergenic spaces between *bcr* genes to determine whether these genes are cotranscribed (Fig. 2B). Results indicated that the *bcrABD* genes are transcribed as a polycistronic message and thus are part of an operon.

### **Genomic DNAs PFGE, plasmid and hybridization analysis**

Plasmid extraction and analysis of *C. perfringens* isolate c1261\_A showed five bands with molecular weights of approximately 3.5 kb, 4 kb, 7.5 kb, 11.5 kb, and 23 kb (data not shown). None of these bands hybridized with the *bcrB* probe. I-CeuI and MluI double-digested genomic DNA of the bacitracin resistant *C. perfringens* strain c1261\_A hybridization experiments with *bcrB* and *rrn* probes showed cohybridization of these probes on one band corresponding to a ~97 kb chromosomal fragment (Fig. 3). Control experiments showed no cross-hybridization between probes (data not shown).

## Discussion

While phenotypic bacitracin resistance has been reported in the past in *C. perfringens*, the genetic basis behind this resistance has not been determined [26,28]. A collection of *C. perfringens* isolates originating from turkey and chicken intestinal tracts was set up and each isolate was typed before susceptibility to bacitracin was determined. Ninety-nine field isolates of *C. perfringens* were recovered from the caeca of turkeys (81) and chickens (18). The *C. perfringens* isolation rates from caecal samples were higher for turkeys (66 %) than for broiler chickens (30 %). This is in agreement with a previous study [28] which demonstrated that *C. perfringens* isolation was more difficult after the chickens reached 22 days of age due to modifications of their intestinal flora. Some birds might have been fed with a bacitracin supplemented diet that could have contributed to a lower recovery rate, as it has been found that bacitracin reduces the count of *C. perfringens* in the caeca of the treated birds [48]. Most of the isolates recovered in the present study were of type A, which is also concordant with previously published data [28,49].

To elucidate the genetic basis of bacitracin resistance in *C. perfringens*, the high-level bacitracin resistant (MIC > 256 µg/mL) *C. perfringens* strain c1261\_A was selected for further studies using a primer walking strategy based on an enterococcal *bcrABD* operon. Sequence analyses of the amplicons generated by the *bcr* primers showed four contiguous ORFs. Two of these genes had high levels of amino acid sequence identity to the *bcrA* and *bcrB* genes of *E. faecalis* suggesting that the genes identified in this study encode for an ABC transporter. This is further supported by the high-level bacitracin resistance observed in the *bcrABDR* positive strains of *C. perfringens*. Reports in the literature suggest that the level of bacitracin resistance given by the ABC transporter is higher than those produced by any other mechanism [45,50]. Matos *et al.* (2009) recently reported that the *bcrA* and *bcrB* genes of *E. faecalis* were sufficient for high-level bacitracin resistance [25].

In addition, *C. perfringens* strain c1261\_A was exposed to efflux pump inhibitors to investigate their influence on susceptibility to bacitracin. Drug efflux pumps

belonging to the ABC, MATE (multiple antimicrobial and toxin extrusion), MFS and SMR (small multi-drug resistance) families are found in Gram-positive bacteria, with MFS-class pumps being predominant [51]. Inhibition of these pumps has been shown to reverse acquired resistance [51]. Some bacterial efflux pump inhibitors have been proposed as viable strategies to combat increasing antimicrobial resistance [51]. Thioridazine is a general bacterial multidrug efflux pump inhibitor which creates ultrastructural changes in membrane-bound enzymes [52]. Verapamil, reserpine and prochlorperazine target the P-glycoprotein-mediated efflux mechanism [51] while probenecid and MK-571 have inhibitory activity against the multidrug resistance-associated protein (MRP) transporters [53,54]. Probenecid has also an activity on organic anions transporters [54]. Results with verapamil, reserpine, prochlorperazine and MK-571 compounds showed a minimal inhibitory effect with a slight influence on the bacitracin MIC values; while probenecid did not influence the MIC of bacitracin. Since thioridazine was the only inhibitor that significantly increased the susceptibility of strain c1261\_A to bacitracin, it can be assumed that an efflux pump is involved in bacitracin resistance and that this mechanism is likely organic anions transporters-independent. Also, it can be speculated that MRP and P-glycoprotein mediated efflux are not the main mechanisms involved in bacitracin resistance. Definitive functional proves that the *bcrABDR* genes can confer bacitracin resistance in these strains awaits construction and complementation of deletion mutants (*bcrR*, *bcrAB*, *bcrRAB*, *bcrD*, *bcrRD*) which is presently underway in our laboratory. Semi-quantitative RT-PCR demonstrated that the *bcrABDR* gene cluster expresses when *C. perfringens* are subjected to bacitracin stress. It was also found that the *bcrABD* genes are transcribed as a polycistronic message and thus are part of an operon. These results are in agreement with the results obtained by Manson *et al.* [21], who found that the ABC transporter and an overproduced undecaprenol kinase were both encoded by a *bcrABD* operon under the control of a regulator *bcrR*, which was described as a membrane bound sensor and a transducer of bacitracin availability to regulate *bcrABD* expression.

Plasmid and hybridization analyses revealed that the location of the *bcr* genes of the *C. perfringens* c1261\_A strain was not on plasmid fragments. To further explore the

*bcr* genes location, PFGE was performed with chromosomal DNAs. The I-CeuI restriction enzyme that was used cuts only in the 23S rRNA genes (*rrn* genes), which are localized only on the chromosome. Thus, chromosomal fragments could be differentiated from plasmid bands with the *rrn* probe. In this study, both the *bcrB* and *rrn* probes colocalized on a ~97 kb fragment indicating that the *bcr* are chromosomal genes. This is in agreement with previous reports where all other bacterial genera, except for *E. faecalis* [21], were harbouring bacitracin resistance genes on the chromosome [24,50,55]. Curiously, the putative ABC transporter identified in this study seems genetically closer to the acquired plasmid-borne ABC transporter in *E. faecalis* [21] than the ABC transporters previously described for *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *S. mutans* [24,50,55]. Also, it is potentially regulated by a single protein which contains a XRE domain with homology to the *E. faecalis* regulator, BcrR [21]. The XRE family of transcriptional regulators contains also regulators involved in stress responses in bacteria [56]. In all other bacitracin efflux ABC transporters described to date, such as *B. licheniformis* and *B. subtilis*, regulation is performed by a two-component system of a sensor kinase and a response regulator localized on a chromosomal operon. There are also some differences between the *bcrABDR* cluster of this study and the one described in *E. faecalis*. The *C. perfringens bcrD*, *bcrB* and *bcrA* are smaller than their *E. faecalis* counterparts (185 bp, 226 bp, and 234 bp shorter, respectively). The distance between the *bcrA* and the *bcrB* genes is larger in *C. perfringens* (441 bp versus -7 bp in *E. faecalis*). We also report, for the first time to our knowledge, on the insertion of IS1216-like transposase gene flanking the chromosomal bacitracin genes of *C. perfringens* c1261\_A. These results suggest that this IS1216-like element originated from *E. faecalis* and that we may anticipate the emergence of novel, IS1216-based composite mobile elements in *C. perfringens*.

Microarray results revealed that the bacitracin resistant strains of this study all contained both *tetA(P)* and *tetB(P)* genes, which mediate active tetracycline efflux and ribosomal protection, respectively [46], while only one isolate harbour a MLS<sub>B</sub> resistant gene, *erm(B)*. This is in agreement with previous studies [27,57] that reported on reduced susceptibility to tetracycline in poultry *C. perfringens*. However, no other antimicrobial resistant genes were detected in our isolates indicating a low

degree of resistance to most other antimicrobials tested as previously described [27,57].

In conclusion, this study reports for the first time the characterization of putative bacitracin efflux pump and an overproduced undercaprenol kinase genes associated with acquired bacitracin resistance in a high-level bacitracin resistant *C. perfringens* strain c1261\_A of poultry origin. Zinc bacitracin is used in poultry production in the United-States and Canada. This practice has likely selected for *C. perfringens* strains encoding for bacitracin resistance genes. Bacitracin resistance genes have been described in *E. faecalis* and these genes have high sequence identities with the genes described in this study; thus, a common origin for the bacitracin resistance genes between the two genera is possible. Further investigations are needed to determine the role of each gene and how widespread these genes are in *Clostridium* strains and species from different origins.

## **Acknowledgements**

This work was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M. Archambault (RGPIN-191461) and the Poultry Industry Council (PIC-212) of Canada. We thank Drs. Martine Boulianne, Ann Letellier and Sylvain Quessy for supplying the poultry caeca sample collection; Guy Fontaine and Philippe Garneau for assistance with sequences and microarrays analysis; and Drs. Gregory Cook, John F. Prescott, Alexandre Thibodeau and Hugh Cai for providing control strains for this study.



## References

1. Petit L, Gibert M, Popoff MR (1999) *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol 7: 104-110.
2. Rood JI, Cole ST (1991) Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol Rev 55: 621-648.
3. Myers GS, Rasko DA, Cheung JK, Ravel J, Seshadri R, *et al.* (2006) Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. Genome Res 16: 1031-1040.
4. Songer JG (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin Microbiol Rev 9: 216-234.
5. Lepp D, Roxas B, Parreira VR, Marri PR, Rosey EL, *et al.* (2010) Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. PLoS ONE 5: e10795.
6. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, *et al.* (2008) NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. PLoS Pathog 4: e26.
7. Stone KJ, Strominger JL (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. Proc Natl Acad Sci U S A 68: 3223-3227.
8. Stone KJ, Strominger JL (1972) Inhibition of sterol biosynthesis by bacitracin. Proc Natl Acad Sci U S A 69: 1287-1289.
9. O'Donovan CA, Fan-Havard P, Tecson-Tumang FT, Smith SM, Eng RH (1994) Enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with oral bacitracin. Diagn Microbiol Infect Dis 18: 105-109.
10. Pavli V, Kmetec V (2006) Pathways of chemical degradation of polypeptide antibiotic bacitracin. Biol Pharm Bull 29: 2160-2167.
11. Bywater R, McConville M, Phillips I, Shryock T (2005) The susceptibility to growth-promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. J Antimicrob Chemother 56: 538-543.
12. Manson JM, Smith JM, Cook GM (2004) Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use.

- Appl Environ Microbiol 70: 5764-5768.
13. Phillips I (2007) Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. *Int J Antimicrob Agents* 30: 101-107.
  14. Phillips I (1999) The use of bacitracin as a growth promoter in animals produces no risk to human health. *J Antimicrob Chemother* 44: 725-728.
  15. Cain BD, Norton PJ, Eubanks W, Nick HS, Allen CM (1993) Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 3784-3789.
  16. El Ghachi M, Bouhss A, Blanot D, Mengin-Lecreulx D (2004) The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem* 279: 30106-30113.
  17. Cao M, Helmann JD (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis bcrC* bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors. *J Bacteriol* 184: 6123-6129.
  18. Podlesek Z, Comino A, Herzog-Velikonja B, Zgur-Bertok D, Komel R, *et al.* (1995) *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* 16: 969-976.
  19. Bernard R, Guiseppi A, Chippaux M, Foglino M, Denizot F (2007) Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*: unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. *J Bacteriol* 189: 8636-8642.
  20. Lis M, Kuramitsu HK (2003) The stress-responsive *dgk* gene from *Streptococcus mutans* encodes a putative undecaprenol kinase activity. *Infect Immun* 71: 1938-1943.
  21. Manson JM, Keis S, Smith JM, Cook GM (2004) Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3743-3748.
  22. Fiedler W, Rotering H (1988) Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* 263: 14684-14689.
  23. Pollock TJ, Thorne L, Yamazaki M, Mikolajczak MJ, Armentrout RW (1994) Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *J Bacteriol* 176: 6229-6237.

24. Tsuda H, Yamashita Y, Shibata Y, Nakano Y, Koga T (2002) Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3756-3764.
25. Matos R, Pinto VV, Ruivo M, Lopes Mde F (2009) Study on the dissemination of the *bcrABDR* cluster in *Enterococcus spp.* reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance. *Int J Antimicrob Agents* 34: 142-147.
26. Watkins KL, Shryock TR, Dearth RN, Saif YM (1997) *In-vitro* antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet Microbiol* 54: 195-200.
27. Slavic D, Boerlin P, Fabri M, Klotins KC, Zoethout JK, *et al.* (2011) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J Vet Res* 75: 89-97.
28. Chalmers G, Martin SW, Hunter DB, Prescott JF, Weber LJ, *et al.* (2007) Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol*.
29. Garmory HS, Chanter N, French NP, Bueschel D, Songer JG, *et al.* (2000) Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* 124: 61-67.
30. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.
31. Chalmers G, Bruce HL, Hunter DB, Parreira VR, Kulkarni RR, *et al.* (2008) Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J Clin Microbiol* 46: 3957-3964.
32. Lukashin AV, Borodovsky M (1998) GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res* 26: 1107-1115.
33. Champagne J, Diarra MS, Rempel H, Topp E, Greer CW, *et al.* (2011) Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. *Appl*

- Environ Microbiol 77: 2625-2633.
34. Bruant G, Maynard C, Bekal S, Gaucher I, Masson L, *et al.* (2006) Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 72: 3780-3784.
  35. Garneau P, Labreque O, Maynard C, Messier S, Masson L, *et al.* (2010) Diagnostic microarray for antimicrobial resistance bacterial gene (ABG) identification. Journal of Zoonoses and Public Health In press, SP-8.
  36. Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrín F, Levesque RC, *et al.* (2003) Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. Antimicrob Agents Chemother 47: 3214-3221.
  37. Letowski J, Brousseau R, Masson L (2004) Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. J Microbiol Methods 57: 269-278.
  38. Frye JG, Jesse T, Long F, Rondeau G, Porwollik S, *et al.* (2006) DNA microarray detection of antimicrobial resistance genes in diverse bacteria. Int J Antimicrob Agents 27: 138-151.
  39. Lyrstis M, Bryant AE, Sloan J, Awad MM, Nisbet IT, *et al.* (1994) Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. Mol Microbiol 12: 761-777.
  40. Kather EJ, Marks SL, Foley JE (2006) Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol 113: 97-101.
  41. Hendricks O, Molnar A, Butterworth TS, Butaye P, Kolmos HJ, *et al.* (2005) *In vitro* activity of phenothiazine derivatives in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Basic Clin Pharmacol Toxicol 96: 33-36.
  42. Kulkarni RS, Kanekar PP (1998) Effects of some curing agents on phenotypic stability in *Pseudomonas putida* degrading  $\epsilon$ -caprolactam. World J of Microbiol and Biotech 14: 255-257.
  43. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ (1995) A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal Biochem 226: 235-240.

44. Harel YM, Bailone A, Bibi E (1999) Resistance to bacitracin as modulated by an *Escherichia coli* homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from *Bacillus licheniformis*. J Bacteriol 181: 6176-6178.
45. Bernard R, El Ghachi M, Mengin-Lecreux D, Chippaux M, Denizot F (2005) BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. J Biol Chem 280: 28852-28857.
46. Sloan J, McMurry LM, Lyras D, Levy SB, Rood JI (1994) The *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: *tetA(P)*, which mediates active tetracycline efflux, and *tetB(P)*, which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. Mol Microbiol 11: 403-415.
47. Spigaglia P, Carucci V, Barbanti F, Mastrantonio P (2005) ErmB determinants and Tn916-Like elements in clinical isolates of *Clostridium difficile*. Antimicrob Agents Chemother 49: 2550-2553.
48. Engberg RM, Hedemann MS, Leser TD, Jensen BB (2000) Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. Poult Sci 79: 1311-1319.
49. Songer JG (1996) Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. Clinical Microbiology Reviews 9: 216-234.
50. Bernard R, Joseph P, Guiseppi A, Chippaux M, Denizot F (2003) YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett 228: 93-97.
51. Kaatz GW (2002) Inhibition of bacterial efflux pumps: a new strategy to combat increasing antimicrobial agent resistance. Expert Opin Emerg Drugs 7: 223-233.
52. Thanacoody HK (2007) Thioridazine: resurrection as an antimicrobial agent? Br J Clin Pharmacol 64: 566-574.
53. Dahan A, Amidon GL (2009) Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: the role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. Mol Pharm 6: 19-28.
54. Lismond A, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP, Courvalin P, Van Bambeke F (2008) Cooperation between prokaryotic (Lde) and eukaryotic (MRP) efflux

- transporters in J774 macrophages infected with *Listeria monocytogenes*: studies with ciprofloxacin and moxifloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3040-3046.
55. Neumuller AM, Konz D, Marahiel MA (2001) The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem* 268: 3180-3189.
56. Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, *et al.* (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4191-4196.
57. Johansson A, Greko C, Engstrom BE, Karlsson M (2004) Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol* 99: 251-257.

**Table 1.** MICs and percentages of bacitracin resistance of *C. perfringens* isolates.

Origin <sup>(a)</sup>	Number of isolates with a MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) of										MIC <sub>90</sub> <sup>b</sup>
	0.75	1	2	3	4	6	8	12	16	> 256	and MIC <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Turkey (81)	0	0	12	16	10	11	3	7	3	19	> 256 6
Chicken (18)	2	1	5	1	1	1	1	1	0	5	> 256 3

<sup>a</sup> Numbers of isolates; the three *C. perfringens* isolates of chicken origin associated with necrotic enteritis had MIC values of 3, 4 and 256  $\mu\text{g/mL}$ ; while the three type E isolates of turkey origin had MIC values of 4, 6 and 12  $\mu\text{g/mL}$ .

<sup>b</sup> Concentration where growth was inhibited in 50 % and 90 % of the isolates.

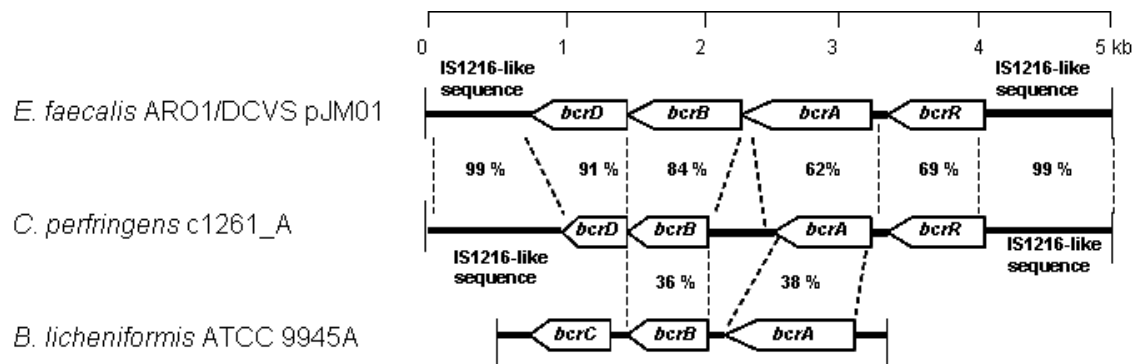
The vertical line indicates the high level bacitracin resistance breakpoint of > 256  $\mu\text{g/mL}$ .

**Table 2.** Bacitracin MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of *C. perfringens* strain c1261\_A grown with different concentrations of efflux pump inhibitors.

	Efflux pump inhibitor concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )													
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
Efflux pump inhibitor	Bacitracin MIC value ( $\mu\text{g/mL}$ )													
(MIC, $\mu\text{g/mL}$ )														
MK-571 (64)	512	512	512	512	512	256	128	-						
Thioridazine (16)	512	512	256	256	8	-	-	-						
Prochlorperazine (64)	512	512	512	512	512	512	256	-						
Verapamil (1024)	512	512	512	512	512	512	512	512	512	256	128	-	-	
Probenecid (1024)	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	-	-	
Reserpine (2048)	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	256	-	

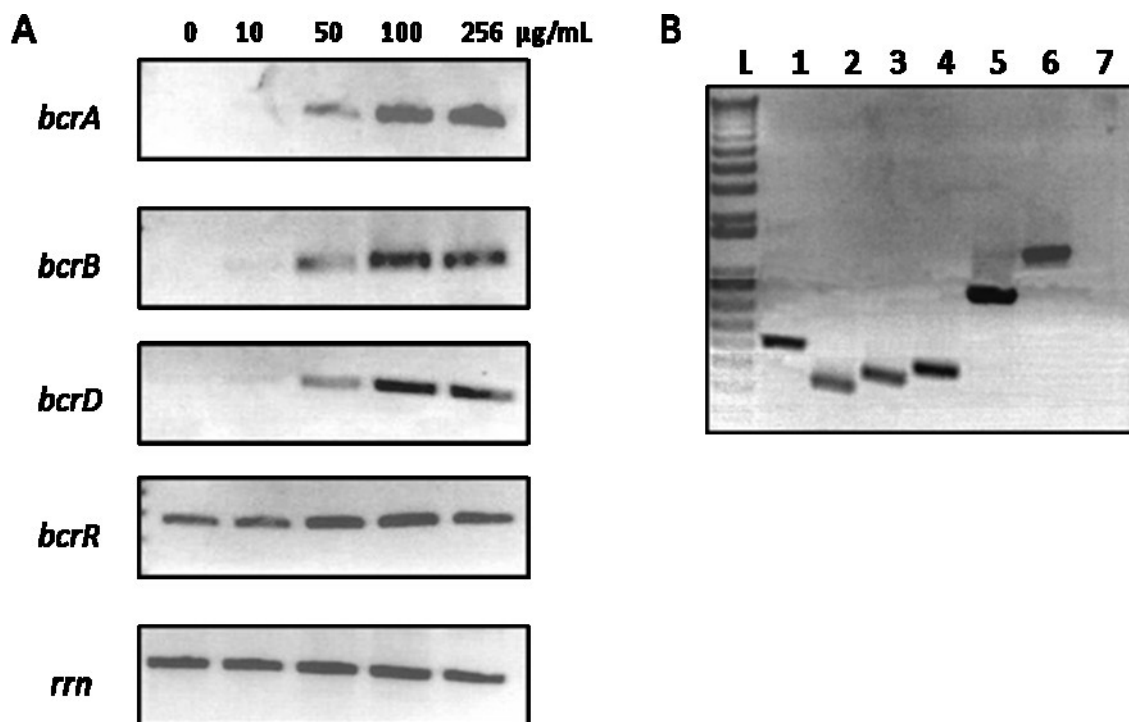
Grey area, concentrations not tested; - , no bacterial growth due to efflux pump inhibitors





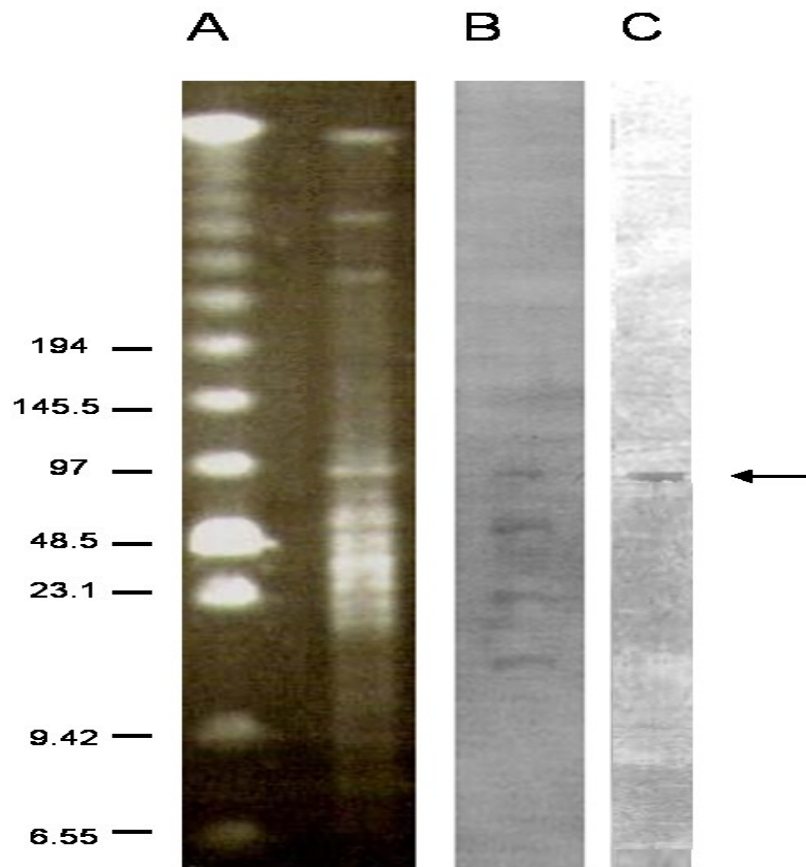
**Figure 1. Comparison between the *C. perfringens* *bcrABDR* genes, the *E. faecalis* *bcrABD* operon and the *B. licheniformis* *bcrABC* operon.**

Organization of *C. perfringens* c1261\_A resistance genes *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, and *bcrR* and comparison with the *bcrABD* operon of *E. faecalis* ARO1/DCVS (AY496968) and the *bcrABC* operon of *B. licheniformis* ATCC 9945A (L20573). Open arrows indicate ORFs. The amino acid percentages indicated relate to the identity between the amino acid sequences of the proteins encoded by the ORFs. The *bcrABC* operon of *B. licheniformis* is inverted to facilitate the comparison.



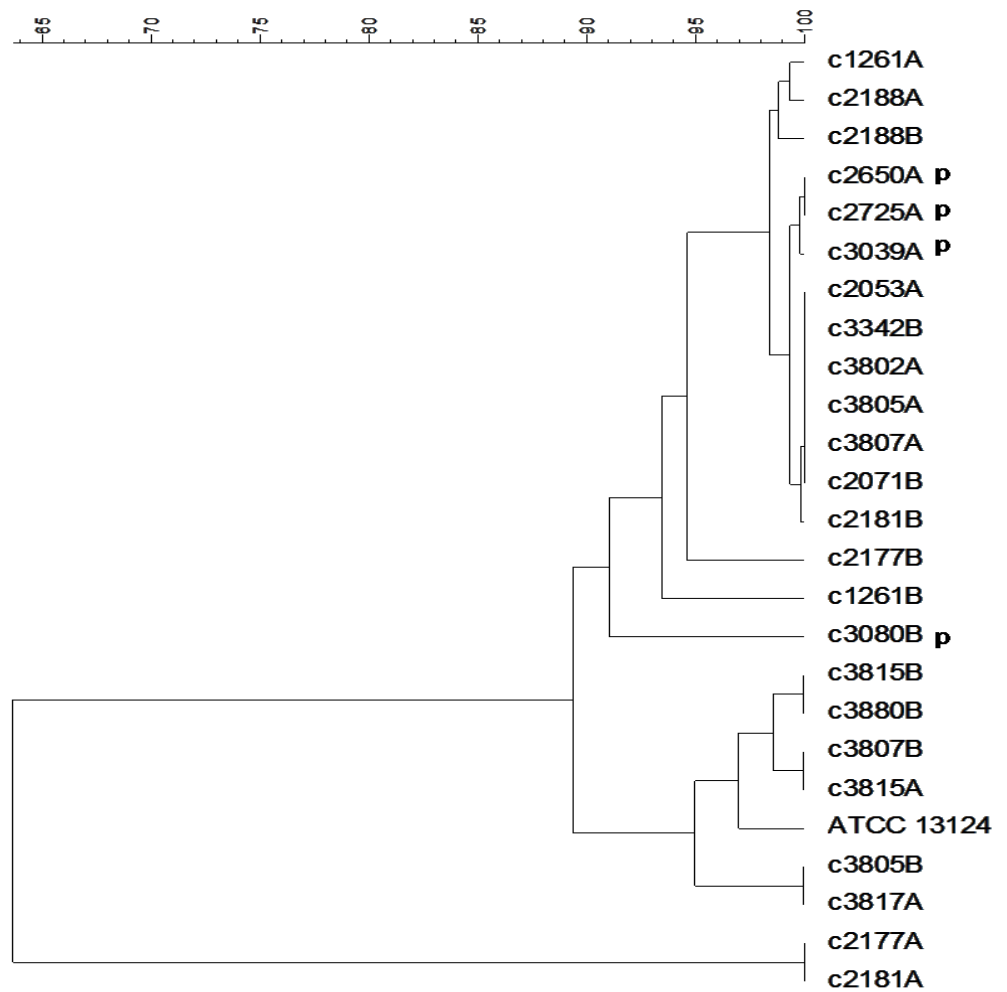
**Figure 2. Expression and cotranscription of *bcrABDR* genes in presence of bacitracin.**

A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of strain c1261\_A grown in various concentrations of bacitracin. Expression of 23S rRNA gene (*rrn*) was used as a control. B) Amplification of intergenic regions by RT-PCR of strain c1261\_A grown in presence of 256 µg/mL of bacitracin. Lane L, DNA ladder; Lane 1, *bcrA*; Lane 2, *bcrB*; Lane 3, *bcrD*; Lane 4, *bcrR*; Lane 5, *bcrD/bcrB* intergenic region; Lane 6, *bcrB/bcrA* intergenic region; Lane 7, *bcrA/bcrR* intergenic region.



**Figure 3. PFGE and hybridization analysis of I-CeuI and MluI double-digested DNA of the bacitracin resistant *C. perfringens* strain c1261\_A.**

PFGE analysis of *C. perfringens* strain c1261\_A total DNA (A). Southern blot of *C. perfringens* isolate c1261\_A total DNA probed with *rrn* (B) and with *bcrB* (C). Sizes (in kilobases) are indicated on the left.



**Figure S1. Dendrogram of the MLVA types of *C. perfringens* resistant isolates.**

Cluster analysis was performed with UPGMA using Pearson coefficient. P: chicken strains; the remaining isolates are of turkey origin.

**Table S1.** Primers for sequencing novel bacitracin resistant genes of *C. perfringens* strain c1261\_A using the primer walking method and new primer designs for PCR screening of *bcrA*, *bcrB*, *bcrD* and *bcrR*.

Primer for sequencing	Primer sequence 5' – 3'	Location	Size of product (bp)
1			
Forward	TACCGTTGGGTGCAAGAATACGGA	26-60	1030
Reverse	ATAGGAGTTTCACGAGTGGCAGCA	1031-1055	
2			
Forward	CCATGCCAATGACAAGTGTGAGCA	941-965	543
Reverse	AGGGCATATGCTTCTTGTGGACGA	1459-1483	
3			
Forward	ACACAAGCTACCGCAACCTTGAAC	1341-1364	434
Reverse	TCTGCCGTGATTGTCATGGGAAGT	1750-1774	
<i>bcrB</i>			
Forward	AAAGAAACCGACTGCTGATA	1622-1641	489
Reverse	GCTTACTTGTATAGCAGAGA	2091-2110	
4			
Forward	ACAGCGTCATATAGCCCACAAACG	2016-2040	340
Reverse	TCAAACCTGATTGGAGGTGGCGGT	2331-2355	
5			
Forward	CAGTACGCTGTCGCTGTATA	2156-2175	1232
Reverse	CTGACACGATAAGTGTCCGA	3368-3387	
6			
Forward	CCGTTTCTGCCGAGCAAACCATAA	3213-3237	308
Reverse	GCACAAGGGATAGCGAAACTGATG	3496-3520	
<i>bcrR</i>			
Forward	TATAGGGTTCTCTTGCCGCT	3488-3507	426
Reverse	GTTACCCTAACATGGAGTCG	3894-3913	
7			
Forward	AGTTCTTCGCCCCGATAGCAGTCAT	3905-3929	276
Reverse	GGGCATATCGGAAAGACGGATACA	4156-4180	
8			
Forward	GTAACCCTTGCCGCTTTCCCATTT	3987-4011	526
Reverse	AGAACCCATAATAGAGCGTGGCGT	4488-4512	
PCR Primer	Sequence (5'-3')	Product length (bp)	
<i>bcrA</i> _CP-F	GGCAATACCAAGCCGTTGCTTCAT	408	
<i>bcrA</i> _CP-R	TTACGAAGCGATACGGAACAGCCA		
<i>bcrB</i> _CP-F	ATAGGTGGCTGTCCACGGATACAA	247	
<i>bcrB</i> _CP-R	CGTTTGTGGGCTATATGACGCTGT		
<i>bcrD</i> _CP-F	TGCTGCCACTCGTGAAACTCCTAT	318	
<i>bcrD</i> _CP-R	TTCTCGTTGTGGTTCAAGGTTGCG		
<i>bcrR</i> _CP-F	AAGGGCGGTTACATAGGGTTGTCT	379	
<i>bcrR</i> _CP-R	ATGTCTGCTATCGGGCGAAGAACT		

**Table S2.** New probe sequences added to the antimicrobial resistance microarray<sup>a</sup>.

<b>Gene<sup>b</sup></b>	<b>Microarray probe sequence</b>
<i>bcrA</i>	gcttgttggcacaactataaggaaaatatccataccctttatagcaaagtaggctctattatcgaaac
<i>bcrB</i>	cctgcttctttggattggtatgctcaccttgaacatgggcaggcatatttatcgtttgggctatat
<i>bcrD</i>	ttggaacaagatgttcccttcaatttaagaacaaagcacagtcaattgttaaaaaggatactttctcg
<i>tetB(P)</i>	ttaatcttaattgcgtttagttatgaagcaaatactctttttattcaatggatcatacgttgtttt
<i>ermQ</i>	cctaggtatttaattactgcatagaattgatttttgtaatacatctcttaagttattaatagacttag

<sup>a</sup> The *bcrR* probe sequence was already on the array.

<sup>b</sup> *ermQ*, a ribosomal methylase gene that mediates MLS<sub>B</sub> resistance [40]; *bcrABD* genes, ABC transporter genes (our study); *tetB(P)*, tetracycline ribosomal protection protein gene [39]; other genes of the antimicrobial resistance microarray were previously described [33].

Article 2

**“Biofilm formation of *Clostridium perfringens*  
and its exposure to low-dose antimicrobials”**

Audrey Charlebois<sup>1</sup>, Mario Jacques<sup>1</sup> and Marie Archambault<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Department of pathology and microbiology, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), University of Montreal, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

\*Corresponding author

Running title: Biofilm of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antibiotics

Publié dans : *Frontiers in Microbiology*, section Antimicrobials, resistance and chemotherapy, 2014

Détail sur le rôle de la candidate dans la conception de l'article : J'ai effectué toutes les manipulations à l'exception des calculs statistiques. J'ai rédigé et révisé l'article dans son ensemble pour la publication.

## Abstract

*Clostridium perfringens* is an opportunistic pathogen that can cause food poisoning in humans and various enterotoxemia in animal species. Very little is known on the biofilm of *C. perfringens* and its exposure to subminimal inhibitory concentrations of antimicrobials. This study was undertaken to address these issues. Most of the *C. perfringens* human and animal isolates tested in this study were able to form biofilm (230/277). Porcine clinical isolates formed significantly more biofilm than the porcine commensal isolates. A subgroup of clinical and commensal *C. perfringens* isolates was randomly selected for further characterization. Biofilm was found to protect *C. perfringens* bacterial cells from exposure to high concentrations of tested antimicrobials. Exposure to low doses of some of these antimicrobials tended to lead to a diminution of the biofilm formed. However, a few isolates showed an increase in biofilm formation when exposed to low doses of tylosin, bacitracin, virginiamycin and monensin. Six isolates were randomly selected for biofilm analysis using scanning laser confocal microscopy. Of those, four produced more biofilm in presence of low doses of bacitracin whereas biofilms formed without bacitracin were thinner and less elevated. An increase in the area occupied by bacteria in the biofilm following exposure to low doses of bacitracin was also observed in the majority of isolates. Morphology examination revealed flat biofilms with the exception of one isolate that demonstrated a mushroom-like biofilm. Matrix composition analysis showed the presence of proteins, beta 1-4 linked polysaccharides and extracellular DNA, but no poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PNAG). This study brings new information on the biofilm produced by *C. perfringens* and its exposure to low doses of antimicrobials.



## Introduction

The predominant organizational state of bacteria in nature is biofilms. They have been defined as a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced extracellular matrix composed primarily of exopolysaccharides (Costerton *et al.*, 1999). The process of biofilm formation involves the following stages: attachment, maturation and dispersion (Davey and O'Toole G, 2000; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). Features of cells in biofilms include: aggregation in suspension or on solid surfaces, increased antibiotic resistance, protection from phagocytosis and immune cells, and resistance to physical and environmental stresses (Davey and O'Toole G, 2000; Davies, 2003; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). In *Pseudomonas aeruginosa*, extracellular DNA present in the matrix was shown to chelate cations and to induce the expression of antibiotic resistance (Mulcahy *et al.*, 2008). Also, promotion of biofilm formation was observed through the ability of extracellular DNA to chelate  $Mg^{2+}$  (Mulcahy and Lewenza, 2011). Recently, current knowledge of bacterial biofilms in animal pathogens was reviewed (Jacques *et al.*, 2010) and surprisingly, very little is known about the biofilm formed by *Clostridium perfringens*.

*C. perfringens* is a Gram-positive anaerobic bacterium that causes numerous human and animal diseases, primarily as a result of its ability to produce many different toxins (Markey *et al.*, 2013). A classification based on the production of four major toxins (alpha, beta, epsilon, and iota) divides the *C. perfringens* into five toxigenic biotypes (A to E) (Petit *et al.*, 1999). *C. perfringens* has been ranked by the Center for Disease Control and Prevention as one of the most common bacterial causes of food-borne illness in the United States, causing nearly a million cases each year, and is also classified as a class-B bioterrorism agent (Scallan *et al.*, 2011). Recently, an increasing number of reports have implicated the organism in antibiotic-associated diarrhea and sporadic diarrhea cases in humans, as well as diarrhea cases in animals (Smedley *et al.*, 2004; Uzal *et al.*, 2012; Banaszkiwicz *et al.*, 2013). In chickens and swine, *C. perfringens* causes enteritis, a disease of economic importance to the worldwide animal-food producing industry in terms of both animal loss and vaccination costs (Markey *et al.*, 2013). Isolates of animal origin constitute a risk for

transmission to humans through the food chain. Recent studies have shown early signs of acquired antibiotic resistance in *C. perfringens* indicating that antibiotic resistance is now emerging (Lyras *et al.*, 2009; Soge *et al.*, 2009; Slavić *et al.*, 2011; Charlebois *et al.*, 2012). *C. perfringens* has been the subject of considerable investigations in the past several years; however, an area of substantial uncertainty relates to biofilm formation with, or without exposure to low-doses of anticoccidials and antibiotics. Anticoccidials are ionophores such as monensin, narasin and salinomycin that are used to prevent/treat infections caused by coccidia, an obligate intracellular parasite, and in some cases for their effect against *C. perfringens*. These compounds are also used as growth promoters in some countries (Callaway *et al.*, 2003; Lefebvre *et al.*, 2006; Diarra *et al.*, 2007).

Only a few studies have reported on *C. perfringens* biofilm formation (Varga *et al.*, 2008; Donelli *et al.*, 2012). Type IV pilus (TFP)-dependent gliding motility and the catabolite control protein (CcpA), a key regulator of the response to carbohydrate limitation, were both shown to be necessary for efficient biofilm formation (Varga *et al.*, 2008). In the same study, the authors also observed that biofilm cells demonstrated 5- to 15-fold-increased survival rate over planktonic cells after exposure to penicillin G and an increased survival to oxygen stresses. It is suspected that biofilms of *C. perfringens* may play an important role in resistance to environmental stresses (Varga *et al.*, 2008). In a study by Ledder (2008) on coaggregation among numerically and ecologically important intestinal bacteria, and between intestinal bacteria and oral isolates, *C. perfringens* scored the highest overall for coaggregation among the gut species tested (Ledder *et al.*, 2008). To our knowledge, no other data is available on biofilms of *C. perfringens*.

Studies demonstrating that low-doses of antibiotics induce bacterial biofilm formation have recently been reviewed by Kaplan (Kaplan, 2011). In contrast, low dose of a fluoroquinolone caused a significant decrease in adhesion and biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* (Pompilio *et al.*, 2010). Also, lower cell densities within biofilms have been reported with sub-MIC of dicloxacillin, a  $\beta$ -lactam antibiotic, for *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*

(Cerca *et al.*, 2005). The effect of sub-MIC of bacitracin, virginiamycin, lincomycin, tylosin and ionophores on biofilm formation has not yet been described in *C. perfringens*. These antibiotics and ionophores are largely used in swine and poultry production for therapy, prophylaxis purposes, or as feed additives (low-dose usage) in some countries.

The aims of this study were to evaluate the biofilm formation of field isolates of *C. perfringens* of various sources, to determine biofilm tolerance to oxygen and antibiotics, and to investigate the effect of low doses of antibiotics and ionophores on biofilm formation.

## **Materials and methods**

### **Bacterial isolates**

Commensal isolates of *C. perfringens* from poultry and swine were recovered from the normal intestinal microbiota of animals taken at seven (five poultry and two swine) processing plants located in the province of Québec, Canada. Isolates were identified and typed by PCR as previously described (Charlebois *et al.*, 2012). Clinical isolates of animal origin were provided by the Clinical Laboratory of Molecular Diagnostic of Université de Montréal (St-Hyacinthe, Canada) and human isolates were provided by the Infectious Disease Research Center of Université Laval (Québec, Canada). Thawed isolates were grown on Columbia agar with 5% sheep blood (Oxoid, Nepean, Ontario, Canada) and then incubated in anaerobic condition at 37°C.

### **Biofilm growth and quantification**

Different temperatures, incubation times and growth media with and without glucose, as well as three different isolates (ATCC 13124, c1261A, FMV-CP12) were used to standardize the biofilm formation assay. More specifically, overnight blood agar cultures of *C. perfringens* were resuspended at a density of 0.5 MacFarland in Trypticase-peptone-glucose (TPG), Fluid thioglycolate (FTG), Tryptic soy broth (TSB) (BD, Mississauga, Ontario, Canada) supplemented or not with 10 mM of filter-sterilized glucose (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), or Brain Heart Infusion (BHI) supplemented or not with 10 mM of filter-sterilized glucose. Two hundred µL of cultures were added in 96-well polystyrene tissue culture plates (Costar® #3595, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) which were then incubated anaerobically at 30°C, 35°C or 44°C for 1, 3 or 6 days in a sealed container. All isolates recovered in this study were tested for biofilm formation. These experiments were done in triplicate and repeated three times. Optimised biofilm growth conditions were as follows: bacterial cells were inoculated in TSB medium supplemented with 10 mM of filter-sterilized glucose and plates were incubated for 6 days at 44°C in an anaerobic environment. To quantify the biofilm formation, the crystal violet assay was used as described elsewhere (Varga *et al.*, 2008). *C. perfringens* ATCC 13124 was used as

positive control because this strain was previously shown to produce biofilm (Varga *et al.*, 2008).

Isolates were categorized as described previously (Stepanovic *et al.*, 2007). Briefly, isolates were divided into the following categories: no biofilm producer, weak biofilm producer, moderate biofilm producer and strong biofilm producer, based upon the previously calculated optical density (OD) values measured at 570 nm:  $OD \leq OD_c$  = no biofilm producer;  $OD_c < OD \leq 2X OD_c$  = weak biofilm producer;  $2X OD_c < OD \leq 4X OD_c$  = moderate biofilm producer;  $4X OD_c < OD$  = strong biofilm producer.  $OD_c$  is defined as three standard deviations (SD) above the mean OD of the negative control. Isolates were also compared in regards to a few parameters: clinical or commensal and animal sources. A subgroup of *C. perfringens* isolates ( $n = 18$ ) was randomly selected for further characterization (Table 1). These were from the collection of isolates recovered in this study from 7 processing plants. To those was added *C. perfringens* ATCC 13124 as a positive control.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

The subset of isolates was tested for MICs as previously described in the CLSI M11-A8 document (CLSI, 2012). Briefly, colonies of *C. perfringens*, from a 24 h culture grown at 37°C on blood agar plates (Oxoid) under anaerobic conditions, were resuspended into 5 mL of saline to achieve a 0.5 McFarland turbidity. This adjusted inoculum was then diluted 1:75 in supplemented Brucella broth. Fifty microliters of this suspension was then transferred to individual wells on microplates containing antibiotics. The microplates were sealed and incubated in an anaerobic chamber for 48 h at 37°C. Antimicrobials tested were penicillin, lincomycin, virginiamycin, tylosin, salinomycin, narasin and monensin (all from Sigma). For bacitracin susceptibility testing, the Etest technique was used as described earlier (Charlebois *et al.*, 2012). Isolates with MIC higher than 256 µg/mL by Etest were tested with the microdilutions broth technique to determine the exact MIC. *C. perfringens* ATCC 13124 was used as a control. Breakpoint for penicillin (2 µg/mL) is available from CLSI M11-A8. There is a previously published breakpoint for bacitracin (16 µg/mL)

that is widely used in the literature (Chalmers *et al.*, 2008; Charlebois *et al.*, 2012). No other breakpoints are available for the antimicrobials tested in this study.

### **Biofilm tolerance to oxygen, antibiotics and anticoccidials**

A subgroup of *C. perfringens* isolates ( $n = 19$ ) was randomly selected from the collection of isolates recovered in this study from 7 processing plants. These isolates were tested for their tolerance to oxygen and antibiotics when grown as biofilms. Biofilms were cultured in triplicates as described above and the initial ATP levels were measured with the BacTiter Glo kit (Promega, Madison, WI, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. After 6 days of incubation, the supernatants were removed and replaced with TSB-glucose in the biofilm cultures. The supernatants of the biofilm containing the planktonic cells were centrifuged and resuspended in fresh TSB-glucose medium. Planktonic cells were then transferred to fresh tissue culture plates. For both the biofilm cultures and planktonic cells, the antibiotic and oxygen tolerance assays were performed. Briefly, plates were incubated anaerobically at 44°C with 1.5 mg/mL of bacitracin, 20 µg/mL of penicillin, 512 µg/mL of lincomycin, 4 µg/mL of virginiamycin, 256 µg/mL of tylosin, 1 µg/mL of narasin, 2 µg/mL of salinomycin or 4 µg/mL of monensin (all antimicrobials from Sigma) for 6 or 24 h. These concentrations of antimicrobials correspond to two times the highest MIC found among the isolates of the random group. The effects of different combinations of anticoccidials and antibiotics (monensin, narasin or salinomycin with bacitracin, tylosin or virginiamycin) on pre-formed biofilms were also analysed. For the oxygen tolerance assay, plates were incubated aerobically at 44°C for 6 or 24 h. After the oxygen and antimicrobial treatments, the ATP levels were measured with the BacTiter Glo kit. Percentages of survival were calculated by dividing the final ATP level by the initial ATP level. Treatment with penicillin was used as a positive control. The effect of low doses of antibiotics and anticoccidials on biofilm formation was assessed on the randomly selected *C. perfringens* isolates ( $n = 18$ ). Briefly, biofilms were cultured as described above with the exception that antibiotics were added at a concentration of 0.1X the MICs of each isolate before incubation. All plates were incubated anaerobically at 44°C for 6 days in a sealed container. All isolates were done in triplicates. To

quantify the biofilm formation, the crystal violet assay was used as described above. Control wells were incubated with medium only.

### **Effects of enzymatic treatments on biofilm formation**

Biofilms of the selected *C. perfringens* isolates ( $n = 19$ ) were grown for 6 days in TSB supplemented with 10 mM of glucose as described above. Wells were washed 2x with distilled water and then filled with 100  $\mu$ L of PBS containing 20  $\mu$ g/mL of dispersin B (Kane Biotech Inc, Winnipeg, Manitoba, Canada) as described by Izano *et al.* (Izano *et al.*, 2007), or 100  $\mu$ g/mL of DNase I or proteinase K (Kaplan *et al.*, 2004;Grasteau *et al.*, 2011). Plates were incubated at 37°C for 5 min for the dispersin B or 1 h for the DNase I and the proteinase K. For the cellulase treatment, wells were filled with 120 U/mL of cellulase and then incubated at 45°C for 72 h (Jain and Bhosle, 2008). After incubation, wells were washed once with distilled water and stained with crystal violet. *S. aureus* ATCC 25923 was used as a positive control for all treatments.

### **Scanning laser confocal microscopy**

Biofilms of the selected *C. perfringens* isolates ( $n = 19$ ) were grown in 96-well plates as described above with or without low doses of bacitracin. Plates were incubated for 6 days at 44°C under anaerobic conditions. After incubation, wells were washed two times with PBS to remove unattached cells. One hundred  $\mu$ L of PBS containing the fluorescent FM 1-43 stain (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), was added to each well to allow visualization of individual bacteria by laser confocal microscopy. In addition, 50  $\mu$ g/mL of calcofluor white dye (Sigma), which is specific for beta-1,3 and beta-1,4 linkages in polysaccharides, was added to each well. This stain was selected because it was previously shown to bind to *C. perfringens* biofilm matrix (Varga *et al.*, 2008). After incubation at room temperature for 30 min and 15 min respectively, wells were washed with 200  $\mu$ L of sterile distilled water. Before readings, 100  $\mu$ L of sterile distilled water was added to each well. An Olympus FV1000 IX81 laser confocal microscope was used to collect three-dimensional images of the biofilms. An argon laser set at 472 nm was used to excite the FM 1-43 dye (emission green) and a UV laser at 364 nm to excite the calcofluor white dye

(emission blue). The images were processed using Fluoview software (Olympus). For the matrix composition, the biofilms were cultured as described above. The fluorophores assay was done as described previously (Wu *et al.*, 2013a). Briefly, after the incubation, the wells were filled with 100  $\mu$ L of Wheat Germ Agglutinin (WGA)–Oregon Green 488, Sypro Ruby Red or BOBO-3 (all from Invitrogen). WGA was diluted 1/100 in PBS whereas BOBO-3 was diluted 1/1500 in water. Sypro Ruby Red was used as described by the manufacturer. Plates were incubated for 30 min at room temperature in the dark then washed once with water and filled with 100  $\mu$ L PBS. The plates were observed by confocal microscopy. The excitation/emission wavelengths for the fluorophores were as follow: 496/524 nm (WGA), 450/610 nm (Sypro Ruby Red) and 570/602 nm (BOBO-3). The images were processed using Fluoview software (Olympus). *S. aureus* ATCC 25923 was used as a positive control for all fluorophores.

### **Statistical analysis**

The statistical significance ( $p$  value) of differences in biofilm between the animal origin or commensal and clinical isolates were calculated with an unequal variance linear model. A Student t-test was used for the biofilm tolerance to oxygen and antibiotics assays, the low-dose and the enzymatic treatments. A  $p < 0.05$  was considered to be significant. Statistics were done with the SAS software v.9.1. (Cary, N.C.).



## Results

### Bacterial isolates

A total of 277 *C. perfringens* isolates of poultry (clinical,  $n = 14$ ; commensal,  $n = 136$ ), swine (clinical,  $n = 34$ ; commensal,  $n = 50$ ), human (clinical,  $n = 9$ ), and other animal origins (clinical isolates from cows [ $n = 12$ ], sheep [ $n = 10$ ], goats [ $n = 3$ ], horses [ $n = 3$ ], deer [ $n = 1$ ], duck [ $n = 1$ ], alpaca [ $n = 1$ ], cat [ $n = 1$ ], dog [ $n = 1$ ] and hare [ $n = 1$ ]) were isolated for this study. A total of 273 isolates were of type A and 4 of type D. Type D isolates were found in clinical samples from bovine ( $n = 1$ ) and ovine ( $n = 3$ ).

### Biofilm growth and quantification

Most of the *C. perfringens* isolates tested were able to form biofilm ( $n = 230/277$ ) in the conditions used in this study. The optical density values at 570 nm ( $OD_{570}$ ) ranged from 0.009 to 0.489 (Fig. 1) indicating that biofilm formation can vary among tested isolates. Of those, strong ( $n = 7$ ), moderate ( $n = 42$ ) and weak ( $n = 181$ ) biofilm producers were observed. Biofilm formation was compared among clinical and commensal isolates of *C. perfringens* of animal origin to test whether there is a difference between these two groups of isolates. The mean OD value of biofilm formed by clinical isolates originating from swine was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the mean OD value of their commensal counterparts (Fig. 1). However, no difference in biofilm formation was observed between clinical and commensal isolates of poultry origin ( $p > 0.05$ ). The low number of clinical poultry isolates was likely not sufficient to allow a statistical significance to be seen. Also, biofilm formation was compared among isolates of *C. perfringens* of different animal origins. No significant difference in biofilm formation was observed between isolates recovered from swine, poultry, human and other animal origins ( $p > 0.05$ ). Again, the low number of human and other animal species isolates was likely not sufficient to allow a statistical significance to be seen. A subgroup of *C. perfringens* isolates ( $n = 18$ ) were randomly selected for further characterization (Table 1). These were from the collection of isolates recovered in this study from 7 processing plants. To those, we included the *C. perfringens* ATCC 13124. The following categories were covered

in this subgroup: commensal, clinical, swine, poultry, human, and different levels of biofilm productions. However, *C. perfringens* isolates of other animal species from this study are not represented in this subgroup.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

Isolates tested ( $n = 19$ ) demonstrated low MICs to penicillin (0.002 to 0.12  $\mu\text{g/mL}$ ), virginiamycin (0.12 to 2  $\mu\text{g/mL}$ ), narasin (0.03 to 0.25  $\mu\text{g/mL}$ ), salinomycin (0.015 to 1  $\mu\text{g/mL}$ ) and monensin (0.015 to 2  $\mu\text{g/mL}$ ) (Table 1). For bacitracin, 13 isolates were susceptible (0.75 to 16  $\mu\text{g/mL}$ ) and 5 were resistant (256 and 512  $\mu\text{g/mL}$ ). For lincomycin, MICs between 0.5 and 512  $\mu\text{g/mL}$  were observed whereas for tylosin, MICs between 0.5 and 128  $\mu\text{g/mL}$  were obtained.

### **Biofilm tolerance to oxygen, antibiotics and anticoccidials**

In the atmospheric oxygen tolerance assays, the mean viability rates of planktonic cells after exposure to oxygen for 6 h and 24 h were 63% and 7.4%, respectively (Fig. 2 A). However, the viability rates were higher (80.6% of viable cells after 6 h and 61% after 24 h) when *C. perfringens* cells were organized in biofilm. Data between planktonic cells and biofilm, obtained after an incubation of 24 h, were significantly different ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2 A). For the antibiotic and anticoccidials tolerance assays, planktonic cells had between 7.0% and 69.1% of viability after 6 h exposure and between 1.2 and 20.7% of viability after 24 h exposure to antibiotics or anticoccidials. On the other hand, cells in biofilm had between 32.7% and 65.0% of viability, and between 14.3 and 47.1% of viability for the same periods of time, corresponding to a 0.6- to 9-fold-increased survival rate after 6 h and to a 0.8- to 36-fold-increased survival rate after 24 h over planktonic cells. Viability rates for cells in biofilm were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those observed for planktonic cells (Fig. 2 B to I). Antibiotics and anticoccidials were also used in combination to determine if there was a synergistic activity towards cells of *C. perfringens* ATCC 13124 within a biofilm (Table 2). A higher activity was observed for 6 combinations but these results were not significant ( $p > 0.05$ ).

### **Bacterial exposure to low doses of antibiotics and anticoccidials**

After exposure of isolates ( $n = 19$ ) to low doses of antibiotics and anticoccidials, no clear trend was observed for bacitracin, tylosin, virginiamycin and monensin (Fig. 3 A, B, D and H) but a few isolates showed an increase in biofilm formation when exposed to those compounds. However, exposure to low doses of penicillin, lincomycin, salinomycin and narasin tended to lead to a diminution of the biofilm formed (Fig. 3 C, E, F and G). This phenomenon was particularly observed within the poultry clinical group of isolates. No other trends could be observed. Statistically significant results are indicated in Fig. 3 ( $p < 0.05$ ).

### **Scanning laser confocal microscopy**

Using laser confocal microscopy, biofilms of tested isolates ( $n = 19$ ) were stained with the fluorescent dyes SYPRO Ruby Red, WGA and BOBO-3 in order to visualize extracellular proteins, poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PNAG) exopolysaccharide and DNA, respectively. Extracellular proteins and DNA were visible in biofilms of all tested isolates (Fig. 4). However, PNAG was absent from the biofilm formed by *C. perfringens* isolates. Binding of calcofluor white to the biofilm matrix was observed. Calcofluor white binds to polysaccharides with beta-1,3 and beta-1,4 linkages. Six isolates (*C. perfringens* c1261\_A, c3807\_A, ATCC 13124, SHY07-383, FMV-CP23 and c3437\_A) were randomly selected to further analyse their biofilms in the presence of low dose of bacitracin ( $0.3 \times \text{MIC}$ ). The biofilms of these isolates grown in the presence of bacitracin were approximately between 35 and 80  $\mu\text{m}$  in height, whereas biofilms formed without bacitracin were thinner with elevations between 30 and 60  $\mu\text{m}$  (Table 3). It was also found that five of them showed an increase in the area occupied by bacteria in the biofilm following exposure to low doses of bacitracin (Table 3). Laser confocal microscopy images showed that the biofilm formed by the *C. perfringens* isolates ( $n = 6$ ) were mainly flat (Fig. 5A) with the exception of one isolate demonstrating a mushroom-like biofilm (Fig. 5B).

### **Enzymatic treatments on biofilm formation**

Dispersion of the biofilm matrix of *C. perfringens* isolates ( $n = 19$ ) was not observed with dispersin B enzymatic treatment confirming that PNAG is absent from the

matrix formed by the tested *C. perfringens* isolates. However, proteinase K, cellulase and DNase I enzymatic treatments significantly dispersed the preformed biofilm ( $p < 0.05$ ) indicating the presence of proteins, beta 1-4 linked polysaccharides and extracellular DNA in the matrix (Fig. 6).

## Discussion

Most of the tested isolates in this study which originated from various animal species were able to form biofilm at various degrees in the conditions used. Optimised biofilm growth conditions were different than those previously described (Varga *et al.*, 2008; Donelli *et al.*, 2012). However, results of this study are in accordance with the ones obtained by Varga *et al.* (2008) where all sequenced strains of *C. perfringens* (biotypes A of ATCC 13124, 13, and SM101), as well as representatives of type C, D, and E strains which cause infections in animals were shown to form biofilms with OD values between 0.07 and 0.5 (Varga *et al.*, 2008). Donelli *et al.* (2012) were able to obtain a higher biofilm formation for *C. perfringens* strain CpeBs31 in their study, with a mean OD of 3.2, which classified this isolate as strongly adherent under the following conditions: BHI supplemented with 1% glucose and 48 h incubation at 37 °C (Donelli *et al.*, 2012). This strain was not tested in our study.

In the present study, clinical isolates recovered from swine formed significantly more biofilm than their commensal counterparts. In *Salmonella* Typhimurium, it was found that clinical, outbreak-associated and retail product isolates produced thicker biofilms compared to isolates recovered from food (Castelijin *et al.*, 2012). Reisner *et al.* (2006) did not observe an increased biofilm formation in human clinical strains of intestinal *Escherichia coli* (Reisner *et al.*, 2006). Skyberg *et al.* (2007) also found that isolates of *E. coli* recovered from healthy birds produced significantly stronger biofilms than isolates from cases of avian colibacillosis (Skyberg *et al.*, 2007). In *Listeria monocytogenes*, it was found that isolates from food formed more biofilm than clinical isolates recovered from cases of listeriosis (Barbosa *et al.*, 2013). For *C. perfringens*, biofilm formation could play a role in the development of the disease because biofilm can help bacteria adhere to surfaces, and this facilitates colonization and infection. Moreover, the ability to grow as a biofilm favors survival of bacteria in the environment (Semenyuk *et al.*, 2014). In this study, it was observed that clinical isolates of swine *C. perfringens* formed more biofilms suggesting these isolates might survive longer in the environment.

*C. perfringens* is known to be an aerotolerant bacterium capable of surviving in soil or water (Rood and Cole, 1991). Results obtained with the atmospheric oxygen tolerance assays showed that the biofilm could protect *C. perfringens* cells from oxygen stress. Varga *et al.* (2008) obtained similar results in their study. The involvement of biofilm in oxygen tolerance has already been described in *Fusobacterium nucleatum*, another anaerobic bacterium (Gursoy *et al.*, 2010). The present study also showed that the biofilm could protect *C. perfringens* from high concentrations of antibiotics and anticoccidials. Increased survival of *C. perfringens* cells in biofilm following penicillin G exposure have been described elsewhere (Varga *et al.*, 2008). Interestingly, virginiamycin, tylosin and the three anticoccidials (namely monensin, narasin and salinomycin) had good activity against cells in biofilm, decreasing the viability below 50%. Virginiamycin has already been found to be active against biofilms formed by some strains of *Lactobacillus* spp. (Rich *et al.*, 2011) but to our knowledge, the effects of tylosin and anticoccidials on biofilm have never been described. Results could not be subdivided between bactericidal and bacteriostatic antimicrobials because bacteriostatic antimicrobials used at high concentrations likely become bactericidal (Pankey and Sabath, 2004). The reverse is also reported, bactericidal agents used at low doses likely become bacteriostatic (Pankey and Sabath, 2004). In the biofilm tolerance assay, antimicrobials were used at high concentrations indicating that tylosin and lincomycin are both likely acting as bactericidal in this experiment. In the bacterial exposure to low doses of antimicrobials assay, all antimicrobials likely became bacteriostatic due to the low doses used in this experiment. Moreover, in the present study, different combinations of antibiotics and anticoccidials were assessed for their activity against cells in biofilm. In general, the viability in the biofilm tended to be lower when exposed to a combination compared to either component used alone. Different combinations of antibiotics have already been described to be active against biofilm of *S. epidermidis*, methicillin-resistant and -susceptible *S. aureus* (MRSA and MSSA), *P. aeruginosa* and *E. faecalis* (Saginur *et al.*, 2006; Tre-Hardy *et al.*, 2008; Holmberg *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013b). This tolerance to antimicrobial agents observed in biofilm makes the treatment of these infections generally ineffective. For *C. perfringens*, it has been hypothesized that biofilm formation by this organism in the small intestine could

contribute to antibiotic-associated diarrhea, a form of non-foodborne enteritis associated with antibiotic use, by facilitating in bacterial persistence through antibiotic treatment (Varga *et al.*, 2008).

Because it has been described that low doses of antibiotics can either reduce or increase the biofilm production in other bacteria (Cerca *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2005; Majtan *et al.*, 2008; Kaplan, 2011), the effect of low concentrations of antibiotics and anticoccidials on *C. perfringens* biofilm formation was studied by microplates assays. No clear trend was observed when exposed to low doses of antibiotics with the exception of penicillin, lincomycin, salinomycin and narasin. In these cases, less biofilm was detected in the majority of isolates. Also, the effect of the antibiotics and anticoccidials on the biofilm varied depending on the strain tested indicating that this phenomenon is strain dependent. These variations among strains have also been observed for *S. epidermidis* exposed to 0.5X the MIC of cefazolin, vancomycin and dicloxacillin, and for *Streptococcus pyogenes* exposed to 0.015X to 0.5X the MIC of fluoroquinolones (Henriques *et al.*, 2005; Balaji *et al.*, 2013). To further analyse the effect of low doses of bacitracin on *C. perfringens* biofilms, laser confocal microscopy was used. An increase in the area occupied by bacteria was observed in biofilms exposed to low doses of bacitracin. This increased area occupied by bacteria has also been observed in *S. epidermidis* biofilms exposed to 0.25X the MIC of erythromycin, in *P. aeruginosa* biofilms exposed to 0.25X the MIC of imipenem and in *Streptococcus intermedius* biofilms exposed to sub-MICs of ampicillin, ciprofloxacin and tetracycline (Bagge *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

To analyse the structure of *C. perfringens* biofilms, laser confocal microscopy was used and results obtained were consistent with the ones found in the study of Varga *et al.* (2008). In this study, most of the biofilms analysed in confocal microscopy were flat with one exception that showed a mushroom-like structure. To our knowledge, this is the first description of a mushroom-like biofilm in *C. perfringens*. For the matrix, it was found that the biofilm of *C. perfringens* contained polysaccharides, proteins and extracellular DNA. Proteins and carbohydrates have already been

described as components of *C. perfringens* biofilms (Varga *et al.*, 2008). In addition to polysaccharides and proteins, extracellular DNA was also found to be a part of the matrix. The presence of extracellular DNA in the matrix of the biofilm has been described in other Gram positive bacteria (Barnes *et al.*, 2012; Domenech *et al.*, 2012; Kaplan *et al.*, 2012) but to our knowledge, not in Clostridia. The mechanisms by which the DNA is released in biofilms are poorly understood but autolysis of cells has been hypothesized to mediate DNA release (Bayles, 2007; Ma *et al.*, 2009). In *E. faecalis*, the release of extracellular DNA by autolysis is regulated by the action of the two proteases GelE and SprE (Thomas *et al.*, 2008) whereas in *S. aureus*, a finely tuned holin/antiholin system is thought to mediate cell lysis and programmed cell death (Bayles, 2007; Rice and Bayles, 2008). A previous study has revealed no extracellular DNA in biofilms of both *Bordetella bronchiseptica* strain 276 and *E. coli* strain ECL 17602 using confocal laser scanning microscopy (Wu *et al.*, 2013a), indicating that extracellular DNA is not a component of all biofilms. The presence of PNAG in the biofilm was studied because it is one of the most common and extensively studied matrix EPS (Jacques *et al.*, 2010). In this study, PNAG was absent from *C. perfringens* biofilm matrix. This has been observed in other bacteria (Wu *et al.*, 2013a). Binding of calcufluor white to the biofilm indicated that polysaccharides with beta-1,3 and beta-1,4 linkages, such as cellulose, are part of the matrix. To confirm this hypothesis, biofilms were treated with cellulase (Jain and Bhosle, 2008). It was observed that this enzyme could disperse the biofilm of *C. perfringens* confirming, for the first time, the presence of beta-1,4 linked polysaccharides in the matrix.

In conclusion, this study reports for the first time the presence of extracellular DNA and beta-1,4 linked polysaccharides in the matrix of *C. perfringens* biofilms. This study also demonstrated that virginiamycin, tylosin and anticoccidials were active against *C. perfringens* cells in biofilm. Exposure to low doses of penicillin, lincomycin, salinomycin and narasin tended to lead to a diminution of the biofilm formation. Further studies are needed to characterize the exopolysaccharides found in the matrix and to identify the genes involved in the biofilm formation in *C. perfringens*.



## **Acknowledgements**

This work was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M. Archambault (RGPIN-191461) and to M. Jacques (RGPIN-003428). We thank the laboratory of molecular diagnostic at the University of Montreal for supplying the clinical samples; Guy Beauchamp for his assistance with the statistical analysis and Frédéric Berthiaume for his expertise with confocal microscopy. We also thank Dr Maurice Boissinot from the Infectious Disease Research Center of Laval University for providing human strains of *C. perfringens*, Dre Martine Boulianne for providing clinical isolates from chicken, and Drs John F. Prescott and Glenn Songer for providing strains CP4 and JGS4143, respectively.

## References

- Ahmed, N.A., Petersen, F.C., and Scheie, A.A. (2009). AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4258-4263.
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P., and Hoiby, N. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1175-1187.
- Balaji, K., Thenmozhi, R., and Pandian, S.K. (2013). Effect of subinhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Indian J Med Res* 137, 963-971.
- Banaszkiewicz, A., Kadzielska, J., Gawronska, A., Pituch, H., Obuch-Woszczatynski, P., Albrecht, P., Mlynarczyk, G., and Radzikowski, A. (2013). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infection and pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*.
- Barbosa, J., Borges, S., Camilo, R., Magalhaes, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., and Teixeira, P. (2013). Biofilm Formation among Clinical and Food Isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Microbiol* 2013, 524975.
- Barnes, A.M., Ballering, K.S., Leibman, R.S., Wells, C.L., and Dunny, G.M. (2012). *Enterococcus faecalis* Produces Abundant Extracellular Structures Containing DNA in the Absence of Cell Lysis during Early Biofilm Formation. *MBio* 3.
- Bayles, K.W. (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 5, 721-726.
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Rychlik, J.L., Genovese, K.J., Poole, T.L., Jung, Y.S., Bischoff, K.M., Anderson, R.C., and Nisbet, D.J. (2003). Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr Issues Intest Microbiol* 4, 43-51.
- Castelijn, G.A., Van Der Veen, S., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., and Abee, T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella Typhimurium* strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling* 28, 51-63.

- Cerca, N., Martins, S., Sillankorva, S., Jefferson, K.K., Pier, G.B., Oliveira, R., and Azeredo, J. (2005). Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71, 8677-8682.
- Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J., and Boerlin, P. (2008). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol* 127, 116-127.
- Charlebois, A., Jalbert, L.A., Harel, J., Masson, L., and Archambault, M. (2012). Characterization of Genes Encoding for Acquired Bacitracin Resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One* 7, e44449.
- Clsi (2012). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard - Eighth Edition. Wayne, PA.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Davey, M.E., and O'toole G, A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2, 114-122.
- Diarra, M.S., Silversides, F.G., Diarrassouba, F., Pritchard, J., Masson, L., Brousseau, R., Bonnet, C., Delaquis, P., Bach, S., Skura, B.J., and Topp, E. (2007). Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 73, 6566-6576.
- Domenech, M., Garcia, E., Prieto, A., and Moscoso, M. (2012). Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ Microbiol*.
- Donelli, G., Vuotto, C., Cardines, R., and Mastrantonio, P. (2012). Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 318-325.

- Grasteau, A., Tremblay, Y.D., Labrie, J., and Jacques, M. (2011). Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 153, 134-143.
- Gursoy, U.K., Pollanen, M., Kononen, E., and Uitto, V.J. (2010). Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of *Fusobacterium nucleatum* in an oral mucosa culture model. *J Periodontol* 81, 1084-1091.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11, 1034-1043.
- Henriques, M., Cerca, N., Azeredo, J., and Oliveira, R. (2005). Influence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobial agents on biofilm formation in indwelling medical devices. *Int J Artif Organs* 28, 1181-1185.
- Hoffman, L.R., D'argenio, D.A., Maccoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., and Miller, S.I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171-1175.
- Holmberg, A., Morgelin, M., and Rasmussen, M. (2012). Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 67, 433-439.
- Izano, E.A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M.H., Velliyagounder, K., Rangunath, C., Kher, W.B., Ramasubbu, N., Jabbouri, S., Perry, M.B., and Kaplan, J.B. (2007). Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* 43, 1-9.
- Jacques, M., Aragon, V., and Tremblay, Y.D. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 11, 97-121.
- Jain, A., and Bhosle, N.B. (2008). Role of beta 1-4 linked polymers in the biofilm structure of marine *Pseudomonas* sp. CE-2 on 304 stainless steel coupons. *Biofouling* 24, 283-290.
- Kaplan, J.B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* 34, 737-751.
- Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W., and Horswill, A.R. (2012). Low Levels of beta-Lactam Antibiotics

Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio* 3.

- Kaplan, J.B., Velliyagounder, K., Ragunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K., and Ramasubbu, N. (2004). Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 186, 8213-8220.
- Ledder, R.G., Timperley, A.S., Friswell, M.K., Macfarlane, S., and McBain, A.J. (2008). Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 66, 630-636.
- Lefebvre, B., Malouin, F., Roy, G., Giguere, K., and Diarra, M.S. (2006). Growth performance and shedding of some pathogenic bacteria in feedlot cattle treated with different growth-promoting agents. *J Food Prot* 69, 1256-1264.
- Lyras, D., Adams, V., Ballard, S.A., Teng, W.L., Howarth, P.M., Crellin, P.K., Bannam, T.L., Songer, J.G., and Rood, J.I. (2009). tISCpe8, an IS1595-family lincomycin resistance element located on a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 191, 6345-6351.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* 5, e1000354.
- Majtan, J., Majtanova, L., Xu, M., and Majtan, V. (2008). *In vitro* effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Slovakia. *J Appl Microbiol* 104, 1294-1301.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., and Maguire, D. (eds.). (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby elsevier.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., and Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* 4, e1000213.
- Mulcahy, H., and Lewenza, S. (2011). Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PLoS ONE* 6, e23307.

- Pankey, G.A., and Sabath, L.D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis* 38, 864-870.
- Petit, L., Gibert, M., and Popoff, M.R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 7, 104-110.
- Pompilio, A., Catavittello, C., Picciani, C., Confalone, P., Piccolomini, R., Savini, V., Fiscarelli, E., D'antonio, D., and Di Bonaventura, G. (2010). Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 59, 76-81.
- Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L., and Molin, S. (2006). *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 188, 3572-3581.
- Rice, K.C., and Bayles, K.W. (2008). Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 85-109, table of contents.
- Rich, J.O., Leathers, T.D., Nunnally, M.S., and Bischoff, K.M. (2011). Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresour Technol* 102, 1124-1130.
- Rood, J.I., and Cole, S.T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev* 55, 621-648.
- Saginur, R., Stdenis, M., Ferris, W., Aaron, S.D., Chan, F., Lee, C., and Ramotar, K. (2006). Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 55-61.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., and Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17, 7-15.
- Semenyuk, E.G., Laning, M.L., Foley, J., Johnston, P.F., Knight, K.L., Gerding, D.N., and Driks, A. (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS One* 9.
- Skyberg, J.A., Siek, K.E., Doetkott, C., and Nolan, L.K. (2007). Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J Appl Microbiol* 102, 548-554.

- Slavić, D., Boerlin, P., Fabri, M., Klotins, K.C., Zoethout, J.K., Weir, P.E., and Bateman, D. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J Vet Res* 75, 89-97.
- Smedley, J.G., 3rd, Fisher, D.J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., and McClane, B.A. (2004). The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 183-204.
- Soge, O.O., Tivoli, L.D., Meschke, J.S., and Roberts, M.C. (2009). A conjugative macrolide resistance gene, *mef(A)*, in environmental *Clostridium perfringens* carrying multiple macrolide and/or tetracycline resistance genes. *J Appl Microbiol* 106, 34-40.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115, 891-899.
- Thomas, V.C., Thurlow, L.R., Boyle, D., and Hancock, L.E. (2008). Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol* 190, 5690-5698.
- Tre-Hardy, M., Vanderbist, F., Traore, H., and Devleeschouwer, M.J. (2008). *In vitro* activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *Int J Antimicrob Agents* 31, 329-336.
- Uzal, F.A., Diab, S.S., Blanchard, P., Moore, J., Anthenill, L., Shahriar, F., Garcia, J.P., and Songer, J.G. (2012). *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. *Vet Microbiol* 156, 395-402.
- Varga, J.J., Therit, B., and Melville, S.B. (2008). Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* 76, 4944-4951.
- Wang, Q., Sun, F.J., Liu, Y., Xiong, L.R., Xie, L.L., and Xia, P.Y. (2010). Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2707-2711.

- Wu, C., Labrie, J., Tremblay, Y.D., Haine, D., Mourez, M., and Jacques, M. (2013a). Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* 115, 30-40.
- Wu, W.S., Chen, C.C., Chuang, Y.C., Su, B.A., Chiu, Y.H., Hsu, H.J., Ko, W.C., and Tang, H.J. (2013b). Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect* 46, 89-95.



**Table 1.** *C. perfringens* selected isolates and their MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) to the antibiotics and anticoccidials tested in this study.

Species	Strains	Origin	Biofilm formation	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )								Source
				Bacitracin	Virginiamycin	Penicillin	Tylosin	Lincomycin	Sulamycin	Nursin	Monsin	
Poultry	c1261_A	Commensal	Weak	512	0.12	0.03	0.5	16	0.12	0.12	0.25	This study
	c2188_B	Commensal	Moderate	512	0.12	0.03	0.5	32	0.12	0.06	2	This study
	c3336_B	Commensal	No	4	1	0.06	128	512	0.12	0.03	1	This study
	c3342_A	Commensal	Moderate	2	1	0.12	128	8	0.25	0.12	0.25	This study
	c3342_B	Commensal	High	256	1	0.0075	128	64	0.25	0.12	1	This study
	c3437_A	Commensal	Moderate	6	2	0.015	128	256	0.25	0.06	2	This study
	c3807_A	Commensal	No	256	1	0.03	64	8	0.25	0.06	2	This study
	STF2005-1256	Clinical	Weak	4	1	0.06	0.5	256	0.25	0.06	0.5	Dr Martine Boulianne
	2006-4758	Clinical	Weak	256	2	0.03	0.5	16	0.06	0.03	0.5	Dr Martine Boulianne
	SHY07-383	Clinical	High	3	0.5	0.0019	0.5	8	0.015	0.03	0.015	Dr Martine Boulianne
	CP4	Clinical	Moderate	1.5	0.5	0.06	1	8	1	0.25	2	Dr John F. Prescott
	JG84143	Clinical	Moderate	8	2	0.015	1	32	0.5	0.06	1	Dr Glenn Songer
	Human	CCRI-16276	Clinical	Moderate	16	0.5	0.03	2	8	0.5	0.25	2
ATCC 13124		Clinical	Weak	2	0.5	0.03	1	0.5	0.06	0.12	0.015	ATCC
Swine	FMV-CP4	Clinical	Moderate	0.75	1	0.06	2	8	0.5	0.12	2	This study
	FMV-CP23	Commensal	No	1	0.5	0.12	1	16	0.25	0.06	1	This study
	FMV-CP71	Commensal	No	0.75	0.12	0.12	4	128	0.25	0.12	0.25	This study
	1285414	Clinical	Moderate	16	2	0.12	0.5	512	0.5	0.12	0.25	This study
	1304504	Clinical	Moderate	2	1	0.03	2	4	0.12	0.03	0.015	This study

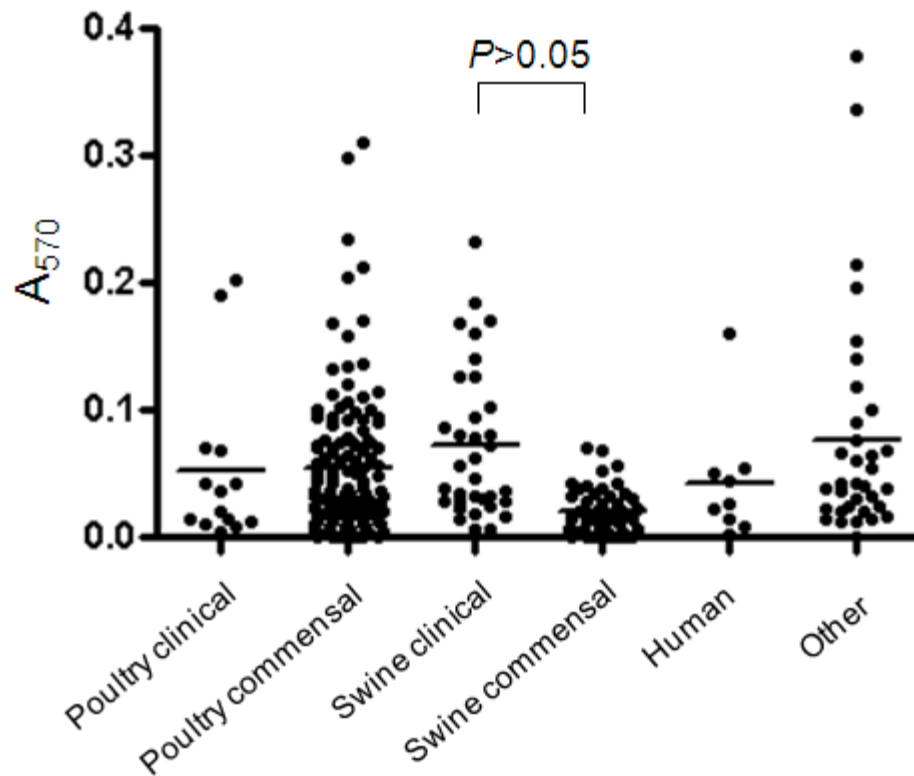
**Table 2.** Viability (%) of *C. perfringens* strain ATCC 13124 in biofilm after 24 h incubation with antibiotics and anticoccidials alone or in combinations.

	Alone	Monensin	Salinomycin	Narasin
Alone	100	65.5	79.5	61.8
Bacitracin	74.2	74.4	<u>67.4</u>	<u>59.0</u>
Virginiamycin	70.5	<u>62.9</u>	<u>58.4</u>	72.1
Tylosin	69.1	77.8	<u>55.9</u>	<u>59.8</u>

Values underlined: values of the combination lower than the antimicrobials used alone

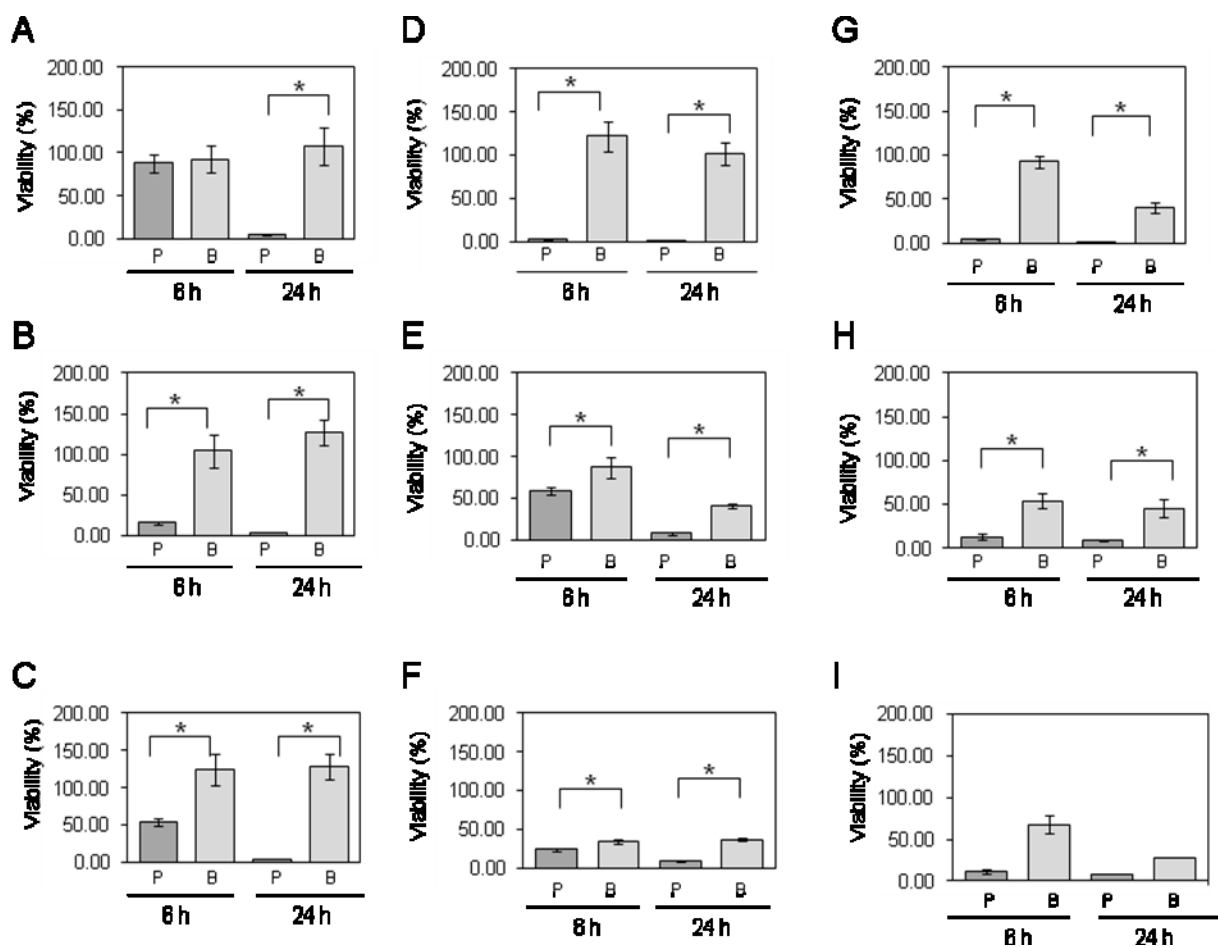
**Table 3.** Effect of subinhibitory concentrations of bacitracin on biofilm formation as analysed by scanning laser confocal microscopy.

	Isolates	Total height ( $\mu\text{m}$ )	Matrix ( $\mu\text{m}$ )	Cells ( $\mu\text{m}$ )
Increased biofilm	c1261_A	35	18	17
	c1261_A + bacitracin	60	40	20
	c3807_A	45	35	10
	c3807_A + bacitracin	75	40	35
	c3437_A	30	22	8
	c3437_A + bacitracin	80	50	30
	SHY07-383	50	25	25
	SHY07-383 + bacitracin	55	20	35
Decreased biofilm	ATCC 13124	45	33	12
	ATCC 13124 + bacitracin	40	23	17
	FMV-CP23	60	35	25
	FMV-CP23 + bacitracin	35	20	15



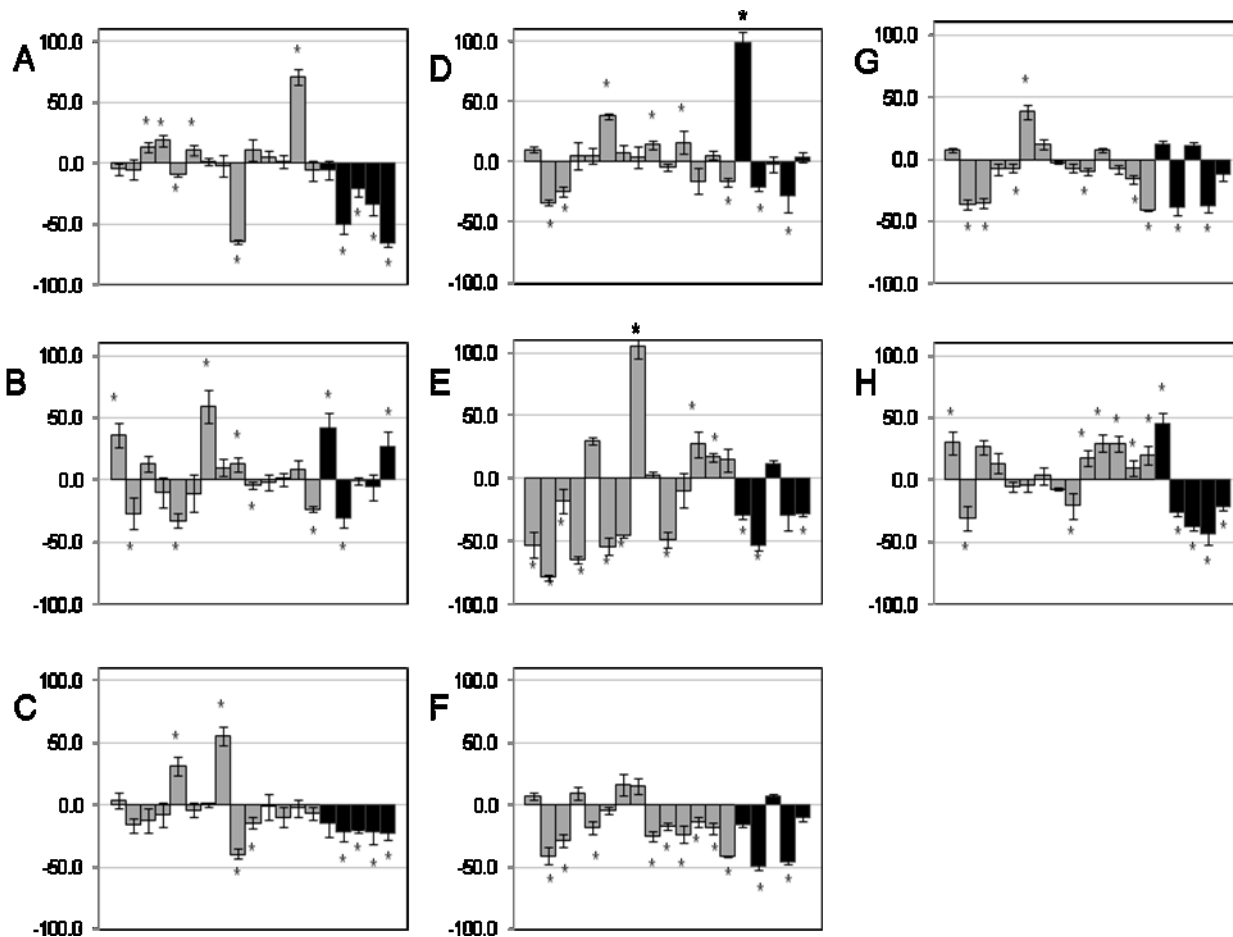
**Figure 1. Biofilm formation by *C. perfringens* isolates.**

Biofilm formation of *C. perfringens* strains in 96-well plates, measured after 6 days as described in Materials and Methods. The  $p$  values were calculated using a linear model for unequal variances. Each dot represents the mean of the replicates for each strain. The bars represent the mean values of each group.



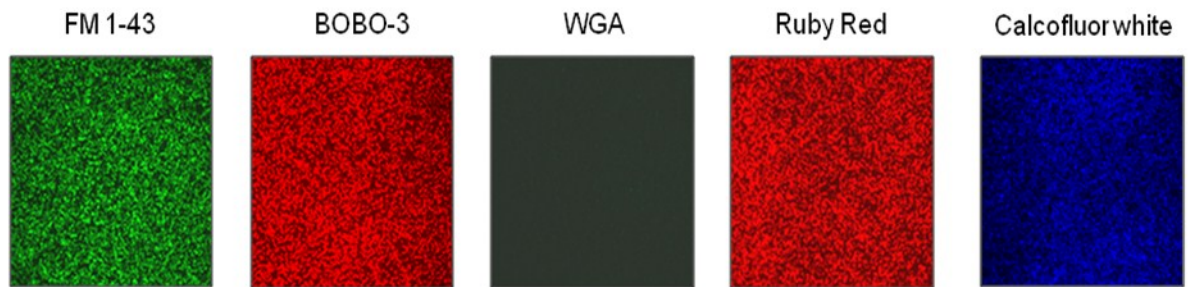
**Figure 2. Viability of planktonic cells compared to cells in biofilm following exposure to oxygen and antimicrobials.**

*C. perfringens* 6-days-old biofilms and planktonic cultures were exposed to (A) atmospheric oxygen, (B) 1.5 mg/mL of bacitracin, (C) 20 µg/mL of penicillin, (D) 512 µg/mL of lincomycin, (E) 4 µg/mL of virginiamycin, (F) 256 µg/mL of tylosin, (G) 4 µg/mL of monensin, (H) 2 µg/mL of salinomycin or (I) 1 µg/mL of narasin for the times indicated. Differences in survival of planktonic cells [P] versus biofilm [B] at each time were compared using Student's *t*-test. \*,  $p < 0.05$ . The error bars represent standard deviations. Results presented are for strain *C. perfringens* ATCC 13124. For all isolates, statistically significant increases in viabilities were observed for bacteria in biofilms compared to planktonic cells.



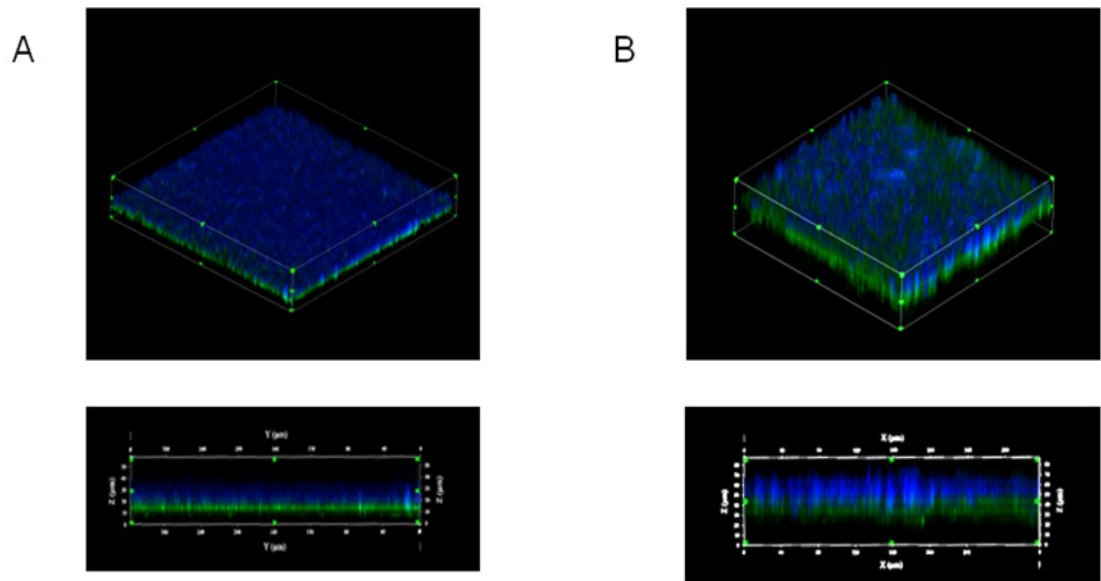
**Figure 3. Effect of low-dose antimicrobials on biofilm formation.**

Biofilm formation of *C. perfringens* strains in 96-well plates in presence of 0.1X MIC of bacitracin (A), tylosin (B), penicillin (C), virginiamycin (D), lincomycin (E), salinomycin (F), narasin (G) or monensin (H), measured as described in Materials and Methods. Strains are in the following order: c1261\_A, c2188\_B, c3336\_B, c3342\_A, c3342\_B, c3437\_A, c3807\_A, ATCC 13124, CCRI-16276, FMV-CP4, FMV-CP23, FMV-CP71, 1285414, 1304504, SHY07-383, STF2003-1256, 2006-4758, CP4 and JGS 4143. Results are expressed as percentages of the control not exposed to antibiotics. Conditions were compared to the control biofilm using Student's *t*-test. \*,  $p < 0.05$ . The error bars represent standard deviation. Black bands represent poultry clinical isolates.



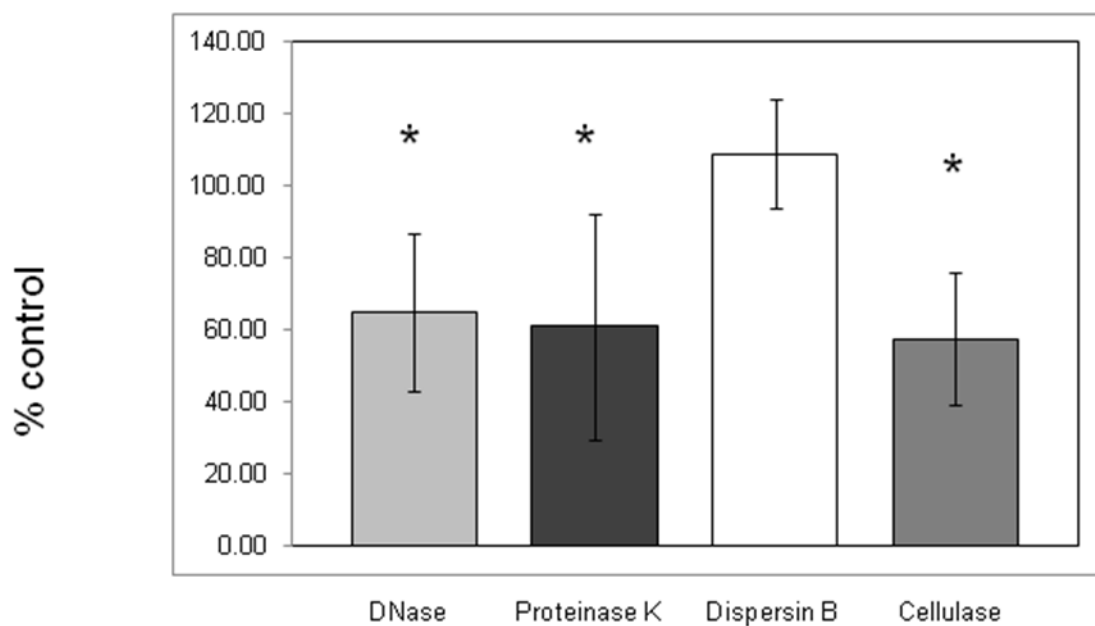
**Figure 4. Matrix composition of *C. perfringens* biofilm.**

Representative results of the matrix composition of *C. perfringens* biofilm observed with fluorescent probes. *S. aureus* ATCC 25923 was used as a positive control for all fluorophores. FM1-43: bacterial cells; BOBO-3: extracellular DNA, WGA: PNAG; Ruby Red: proteins; Calcofluor white: beta-1,3 and beta-1,4 linked polysaccharides.



**Figure 5. Biofilm morphologies observed by scanning laser confocal microscopy.** Biofilms formed by the *C. perfringens* c3437\_A isolate (A) or by the *C. perfringens* SHY07-383 isolate (B) after 6 days of incubation. Blue: exopolysaccharides (Calcofluor white); Green: bacteria (FM 1-43).





**Figure 6. Effect of enzymatic treatments on pre-formed *C. perfringens* biofilm.**

DNase, proteinase K, cellulase and dispersin B effects on pre-formed biofilm of *C. perfringens*. Data were measured as described in Materials and Methods. Results are the average of all strains tested and are expressed as a percentage of the control. The error bars represent standard deviation. \*,  $p < 0.05$ .

Article 3

**“Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in farms and food processing environments”**

Audrey Charlebois<sup>1</sup>, Geneviève Courchesne<sup>1</sup>, Mario Jacques<sup>1</sup>, Martine Boulianne<sup>1</sup> and Marie Archambault<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Department of pathology and microbiology, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), University of Montreal, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

\*Corresponding author

Running title: Disinfection of *Clostridium perfringens* biofilms

Soumis au journal Applied and Environmental Microbiology

Détail sur le rôle de la candidate dans la conception de l'article : J'ai effectué la majorité des manipulations. J'ai rédigé et révisé l'article dans son ensemble pour la publication.

## Abstract

*Clostridium perfringens* is an opportunistic pathogen that can cause food poisoning in humans and various enterotoxemia in animal species. Recently, it was shown to form biofilms, a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced extracellular matrix. Biofilms are serious food safety concerns associated with tolerance to antibiotics, to disinfectants, and to physical and environmental stresses. Very little is known on the biofilm of *C. perfringens* and its exposure to disinfectants. In the present study, susceptibilities of *C. perfringens* biofilms to five types of commonly used disinfectants on farms and in food processing environments were analysed. In this paper, we show that biofilms can protect the bacterial cells from the action of potassium monopersulfate, quaternary ammonium chloride, hydrogen peroxide and glutaraldehyde solutions. However, sodium hypochlorite solution was shown to be more effective on *C. perfringens* biofilms than the other disinfectants tested. Our investigation of dual-species biofilms of *C. perfringens* with the addition of *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* demonstrated that overall, the mono-species biofilm of *C. perfringens* was more tolerant to all disinfectants in aerobic conditions than the dual-species biofilms. For the anaerobic grown biofilms, the mono-species biofilm of *C. perfringens* was more tolerant to sodium hypochlorite and quaternary ammonium chloride than the dual-species biofilms of *C. perfringens* with *S. aureus* or *E. coli*. We propose that *C. perfringens* mono- and dual-species biofilms are an effective protection mechanism to most disinfectants, and likely to other physical and environmental stresses.

## Introduction

*Clostridium perfringens* is a Gram-positive, aerotolerant anaerobic spore-forming bacterium that causes a wide variety of diseases in humans and animals, primarily as a result of its ability to produce many different toxins (1). A classification based on the production of four major toxins (alpha, beta, epsilon, and iota) divides the *C. perfringens* into five toxigenic biotypes (A to E) (2). In humans, *C. perfringens* is responsible for gas gangrene, enteritis necroticans, food poisoning, and antibiotic-associated diarrheas (3). Currently, *C. perfringens* type A food poisoning ranks as the second most commonly reported foodborne illness in Canada (4). This food poisoning is caused by a small group (~5 %) of type A isolates that produce the enterotoxin CPE (5, 6). In poultry, avian-specific *C. perfringens* strains cause necrotic enteritis, an economically significant poultry disease that costs the global industry over \$2 billion annually in losses and control measures (7). In some countries, this disease appears to be on the rise because of removal of antibiotic growth promoters (7). *C. perfringens* is also a cause of various enterotoxemia in other animal species. Isolates of animal origin constitute a risk for transmission to humans through the food chain.

In order to persist in the environment, many bacteria have evolved the ability to form biofilms (8, 9). In fact, the predominant organizational state of bacteria in nature is biofilms (10). Important features of cells in biofilms include: aggregation in suspension or on solid surfaces, increased antibiotic tolerance, and resistance to physical and environmental stresses (9, 11, 12). It is now generally accepted that the biofilm growth mode induces bacterial tolerance to disinfection that can lead to substantial economic and health concerns (13). Although the precise origin of such tolerance remains unclear, different studies have shown that it is a multifactorial process involving the spatial organization of the biofilm. A review has recently discussed the mechanisms identified as playing a role in biofilm tolerance to disinfectants, as well as novel anti-biofilm strategies that have been explored (13). More recently, we, and others, have described the formation of biofilms in *C. perfringens* (14, 15). We demonstrated that the biofilm formed by *C. perfringens*

could protect the cells from an exposure to atmospheric oxygen and to high concentrations of antibiotics and anticoccidial agents (15). It has also been observed that the biofilm formed by *C. perfringens* could protect the cells from an exposure to 10 mM of hydrogen peroxide (14). The capacity of *C. perfringens* to be part of dual- or multi-species biofilm has recently been reviewed (16) and *C. perfringens* biofilm was detected in many types of multi-species biofilm including biliary stents (16, 17). However, susceptibilities of *C. perfringens* mono- and dual-species biofilms exposed to most disinfectants are currently unknown. This study was undertaken to investigate the tolerance of *C. perfringens* mono- and dual-species biofilms to disinfectants used in farms and food processing environments.

## **Materials and methods**

### **Bacterial isolates**

*C. perfringens* isolates used in this study are described in Table 1. Commensal isolates of *C. perfringens* ( $n = 15$ ) from poultry were recovered from the normal intestinal microbiota of animals taken at five processing plants located in the province of Québec, Canada. Isolates were identified and typed by PCR as previously described (18). Clinical isolates ( $n = 15$ ) were from cases of necrotic enteritis from poultry raised without antibiotics. These isolates were kindly provided by Dr Martine Boulianne and the Clinical Laboratory of Molecular Diagnostic of the Université de Montréal (St-Hyacinthe, Québec, Canada). Thawed isolates were grown on Columbia agar with 5 % sheep blood (Oxoid, Nepean, Ontario, Canada) and then incubated in anaerobic condition at 35°C.

### **Disinfectants**

Five types of disinfectants commonly used on farms and in the food processing industry were tested in this study: a quaternary ammonium chloride-based disinfectant (1%) (Aseptol 2000, S.E.C. Repro Inc., Ange-Gardien-de-Rouville, Québec, Canada), a potassium monopersulfate solution (1%) (Virkon, Vétoquinol N.-A. Inc., Lavaltrie, Québec, Canada), a sodium hypochlorite solution (0.27%) (Lavo Pro6, Lavo Inc., Montréal, Québec, Canada), a hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solution (10%) (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), and a gluteraldehyde-based disinfectant (2%) (Gluterate, Germiphene corp., Brantford, Ontario, Canada). Solutions were prepared following the manufacturer's instructions in sterile distilled water. Hydrogen peroxide solution was prepared fresh daily in sterile distilled water from a 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stock solution. The gluteraldehyde-based disinfectant was supplied as a ready-to-use solution.

### **Mono- and dual-species biofilms**

Mono-species biofilms were cultured as previously described (15). Briefly, overnight blood agar cultures of *C. perfringens* were resuspended at a density of 0.5 MacFarland in Tryptic soy broth (TSB) (BD, Ontario, Canada) supplemented with 10

mM of filter-sterilized glucose (Sigma). Two hundred  $\mu\text{L}$  of cultures were added in 96-well polystyrene tissue culture plates (Costar® #3595, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) and incubated anaerobically at  $44^{\circ}\text{C}$  for 6 days in a sealed container. After incubation, medium containing planktonic cells was removed. Biofilms were washed once with MiliQ water to remove unattached cells and air dried for 5 min at room temperature. *C. perfringens* ATCC 13124 was used in the dual-species biofilms along with *Escherichia coli* EcL 17606 and *Staphylococcus aureus* E452b3 which are both facultative anaerobes and kindly provided by the Clinical Bacteriology Laboratories of the Université de Montreal (Table 1). Dual-species biofilms were cultured as described above except that 100  $\mu\text{L}$  of each culture were added per well and plates were incubated anaerobically or aerobically at  $35^{\circ}\text{C}$  for 24h in sealed containers. Isolates were categorized as per their biofilm production as described previously (19). Briefly, isolates were divided into the following categories: no biofilm producer, weak biofilm producer, moderate biofilm producer and strong biofilm producer, based upon the previously calculated optical density (OD) values measured at 570 nm:  $\text{OD} \leq \text{ODc}$  = no biofilm producer;  $\text{ODc} < \text{OD} \leq 2\text{X ODc}$  = weak biofilm producer;  $2\text{X ODc} < \text{OD} \leq 4\text{X ODc}$  = moderate biofilm producer;  $4\text{X ODc} < \text{OD}$  = strong biofilm producer. ODc is defined as three standard deviations (SD) above the mean OD of the negative control.

### **Mono-species biofilms spores formation**

Mono-species biofilms of *C. perfringens* ATCC 13124 were cultured as described above and also with a few modifications to promote spores formation. Briefly, *C. perfringens* were resuspended at a density of 0.5 MacFarland in Duncan-Strong sporulation medium (20). Two hundred  $\mu\text{L}$  of cultures were added in 96-well polystyrene tissue culture plates then incubated anaerobically at  $44^{\circ}\text{C}$  for 6 days in a sealed container. After incubation, medium containing planktonic cells was removed. Mono-species biofilms were washed once with MiliQ water to remove unattached cells and air dried for 5 min at room temperature. Mono-species biofilms were scraped and then transferred on microscope slides which were analysed by dark field microscopy or stained with malachite green and analysed by bright field microscopy.

### **Disinfectant treatments of planktonic and biofilm cells**

Plates containing the mono or dual-species biofilms were treated for 10 min with 100  $\mu\text{L}$  /well of sterile PBS, or with quaternary ammonium chloride, sodium hypochlorite, gluteraldehyde, potassium monopersulfate or  $\text{H}_2\text{O}_2$  solutions. After treatments, disinfectants were removed and 100  $\mu\text{L}$  of sterile PBS was added into each well. Fifty  $\mu\text{L}$  of BacTiterGlo (Promega, Madison, WI, USA) was added in each well and the ATP levels were measured by luminometry, in accordance with the manufacturer's instructions, after an incubation of 5 min at room temperature. For the planktonic cultures, 100  $\mu\text{L}$  of a 0.5 MacFarland culture was transferred in a 96-well polystyrene tissue culture plates (Costar® #3595, Corning Incorporated) and then treated with 100  $\mu\text{L}$  of disinfectant for 10 min. Cultures were then centrifuged and cells were resuspended into 500  $\mu\text{L}$  of sterile PBS. One hundred  $\mu\text{L}$  of the culture was distributed in three wells and the viability was measured with the BacTiterGlo kit as described above. Percentages of survival were calculated by dividing the ATP level of disinfectant-treated sample by the ATP level of the non-treated sample. All isolates were done in triplicates and two independent experiments were performed to obtain the viability mean percentages of the 30 isolates for the five disinfectants.

### **Statistical analysis**

A Student *t*-test was used to compare the planktonic and the biofilm cells viability means after disinfections. A  $p < 0.05$  was considered to be significant.



## Results

### **Mono- and dual-species biofilms**

*C. perfringens* isolates were divided into four categories: no biofilm producer ( $n = 1$ ), weak biofilm producer ( $n = 24$ ), moderate biofilm producer ( $n = 4$ ) and strong biofilm producer ( $n = 2$ ), based upon the above calculated OD values (Table 1). Moderate and strong biofilm producers were found in clinical isolates of poultry whereas in commensal isolates, no and weak biofilm producers were observed. *C. perfringens* ATCC 13124, a weak biofilm producer, was used in the dual-species biofilms along with *Escherichia coli* EcL 17606 and *Staphylococcus aureus* E452b3 which were both classified as moderate and strong biofilm producers, respectively (Table 1).

### **Disinfectant treatments of mono-species biofilms and spore formation**

*C. perfringens* cells in biofilms had significantly higher viability means ( $p < 0.05$ ) compared to those observed for planktonic cells when treated with potassium monopersulfate, quaternary ammonium chloride, hydrogen peroxide and gluteraldehyde solutions (Fig. 1A, C, D, and E). More specifically, the viability mean percentages of planktonic cells of *C. perfringens* dropped to 0.8 %, 2.1 %, 1.8 % and 6.7 %, after treatments with potassium monopersulfate, quaternary ammonium chloride, hydrogen peroxide and gluteraldehyde solutions, respectively (Fig. 1A, C, D, and E). Whereas, the viability mean percentages of *C. perfringens* cells in biofilms were, respectively, of 19.3 %, 50.1 %, 51.5 % and 46.7 % when exposed to these disinfectants (Fig. 1A, C, D, and E). Interestingly, the viability mean percentage that we observed with sodium hypochlorite was significantly higher ( $p < 0.05$ ) for planktonic cells (14.1 %) than for cells in biofilms (3.8 %) (Fig. 1B).

Also, no significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed in viability mean percentages between biofilms of *C. perfringens* isolates of clinical and commensal origins after exposition to disinfectants (Fig. 2). Although, biofilms of clinical isolates tended to be more tolerant to potassium monopersulfate and sodium hypochlorite whereas biofilms of commensal isolates had a tendency to be more tolerant to quaternary ammonium chloride, hydrogen peroxide and gluteraldehyde (Fig. 2). No significant

difference ( $p > 0.05$ ) was found in viability mean percentages following disinfectant treatments between biofilms of *C. perfringens* isolates forming weak and moderate biofilms (Fig. 3). Low numbers of isolates forming high and no biofilms did not allow statistical comparison. No spores were detected within the biofilms formed by *C. perfringens* (data not shown).

### **Disinfectant treatments of dual-species biofilms**

All disinfectants were further tested with multi-species biofilms of *C. perfringens* to assess their effectiveness on mixed biofilm matrix. Overall, the mono-species biofilm of *C. perfringens* was statistically ( $p < 0.05$ ) more tolerant to all disinfectants in aerobic conditions, with total viability mean percentages between 21.2 % and 86.7 %, than the dual-species biofilms of *C. perfringens* with *S. aureus* (total viability mean percentages between 1.6 % and 49.7 %) or *E. coli* (total viability mean percentages between 2.0 % and 36.8 % (Fig. 4A to E). Among other points to note, the mixed biofilms were statistically more tolerant than the mono-species biofilm of *S. aureus* or *E. coli* for sodium hypochlorite (Fig. 4B). However, the mixed biofilms were statistically less tolerant than the mono-species biofilm of *S. aureus* or *E. coli* for quaternary ammonium chloride (Fig. 4C). Both situations were observed for glutaraldehyde depending on the strains (Fig 4E). For the anaerobic grown biofilms, the mono-species biofilm of *C. perfringens* was statistically ( $p < 0.05$ ) more tolerant to sodium hypochlorite and quaternary ammonium chloride than the dual-species biofilms of *C. perfringens* with *S. aureus* or *E. coli* (Fig. 4B and C). Also, the mixed biofilms were statistically ( $p < 0.05$ ) more tolerant than the mono-species biofilm of *S. aureus* or *E. coli* for sodium hypochlorite and hydrogen peroxide (Fig. 4B and D). Tolerance to potassium monopersulfate and glutaraldehyde in anaerobic conditions was shown to be strain depend (Fig. 5A and E).

## Discussion

In this study, five types of disinfectants commonly used on farms and in food processing environments were analysed for their abilities to reduce the viability of *C. perfringens* cells engulfed in a biofilm compared to their planktonic counterparts. *C. perfringens* cells in biofilms had significantly higher viability means ( $p < 0.05$ ) compared to those observed for planktonic cells when treated with potassium monopersulfate, quaternary ammonium chloride, hydrogen peroxide and glutaraldehyde solutions. Biofilm growth mode has been associated with bacterial tolerance to disinfection (13, 21, 22). Different studies have shown that it is likely due to multifactorial processes involving the spatial organization of the biofilm and a review has recently discussed these mechanisms (13). Indeed, the multiple layers of cells and extracellular polymeric substance (EPS) may constitute a complex and think structure within which biocides penetrate with difficulty to reach internal layers. Apart from diffusion limitations that may occur, the penetration of biocide into microbial biofilms is also controlled by the reaction of the disinfectant with biofilm components such as organic matter, inorganic particles and cell debris (21, 22). Furthermore, the EPS is charged and can therefore bind to biocides before they reach the target cell, while the metabolism of cells within biofilms is different from that of planktonic cells (13, 23).

This study revealed that sodium hypochlorite was the most effective disinfectant against *C. perfringens* biofilms. This data is consistent with other studies where sodium hypochlorite was shown to be active against bacteria in biofilms (24-26). Sodium hypochlorite has been proposed as an effective mean to depolymerize and remove the EPS that protects bacteria against disinfection (27). Sodium hypochlorite-based disinfectants are the most commonly used reagents in food processing plants because they are generally effective against a wide variety of bacteria (24). In this study, biofilms of clinical isolates tended to be more tolerant to potassium monopersulfate and sodium hypochlorite whereas biofilms of commensal isolates had a tendency to be more tolerant to quaternary ammonium chloride, hydrogen peroxide and glutaraldehyde. It has been shown that hydrogen peroxide was able to

penetrate and kill a subset of the cells only in a biofilm formed by catalase-deficient *Pseudomonas aeruginosa* (28). It was demonstrated that bacteria of a wildtype biofilm were protected from hydrogen peroxide penetration by catalase-mediated destruction of the biocide (28). Recent studies have shown that genes coding for protective enzymes against oxidizing stress were under the control of quorum sensing (13). It is tempting to speculate that biofilm tolerance of some commensal strains of *C. perfringens* to hydrogen peroxide could be due to the presence of oxidative stress enzymes in the matrix and under quorum sensing regulation, but this hypothesis warrants further investigations using transcriptomic studies.

Also, no significant difference ( $p > 0.05$ ) was found in viability mean percentages following disinfectant treatments between biofilms of *C. perfringens* isolates forming weak, moderate or strong biofilms. One could speculate that strong biofilm producers should be more tolerant to biocides. However, many studies have shown that transport limitations are important mechanisms that contribute to the resistance of biofilms to disinfectants that seem related to physicochemical interactions between the biocide and EPS or bacterial cells rather than steric hindrance inside the biofilm (13). Also, it was shown that despite biocide effective penetration into a biofilm, only a low level of inactivation was achieved (29). For example, *Staphylococcus aureus* biofilm tolerance to quaternary ammonium compound has been largely attributed to phenotypic modifications to cells rather than to the protective presence of the EPS matrix (30). These phenotypic adaptations are linked with the expression of particular genes in response to their environment (13). During the adhesion step, studies have shown that genes coding flagellar proteins are repressed while other genes coding for EPS and curli are induced (31, 32). Following the adhesion, bacteria develop into a biofilm with a three-dimensional structure where cells located at the periphery have access to nutrients and oxygen, while those in internal layers have poorer environments containing more metabolic waste elements (13). It has been stated that this chemical heterogeneity is the source of the physiological heterogeneity (33) where cells with distinctive metabolic rates are present throughout the biofilm. This induces modifications to membrane composition and in defense mechanism expressions leading to an increase in tolerance of bacteria to disinfectants (34, 35).

Also, it has been reported that a small part of the bacterial population within a biofilm may develop into a highly protected state with drastic resistance and referred to as persisters (36, 37). They may therefore contribute to disinfectant protection in the biofilm (36, 37). These studies illustrate that many mechanisms are involved in biofilm tolerance to biocides (38). More recently, biofilm tolerance to sanitization was shown to be strain-dependent in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) regardless of the serotypes and that curli expression appeared to play a critical role in STEC biofilm formation and tolerance to sanitizers (24).

The capacity of *C. perfringens* to be part of dual- or multi-species biofilm has recently been reviewed (16) and *C. perfringens* biofilm was detected in some types of multi-species biofilm (16, 17). Surprisingly, no data is available on tolerance of *C. perfringens* dual-species biofilms to disinfectants. This raises the question whether *C. perfringens* are able to form multi-species biofilms that protect the embedded bacteria from toxic molecules coming from the environment. Conditions used for dual-species biofilm formation were modified to allow growth of all bacteria. In these new conditions, the mono-species biofilms of *C. perfringens* grown in aerobic conditions were more tolerant to all disinfectants than the dual-species biofilms of *C. perfringens* with *S. aureus* or *E. coli*. In anaerobic conditions, *C. perfringens* mono-species biofilms were more tolerant to sodium hypochlorite and quaternary ammonium chloride than the dual-species biofilms of *C. perfringens* with *S. aureus* or *E. coli*. This could possibly be associated with an increased strength of the mono-species biofilms of *C. perfringens* compared to that of *S. aureus* and *E. coli* due to spore formation. However, in this study, no spores were detected within the biofilms formed by *C. perfringens*. Little is known on sporulation processes and biofilm formation in *C. perfringens*. Recently, it was shown that temperature regulates *C. perfringens* biofilm morphology and that a sporulation master regulator was involved at a particular temperature (39). It was shown that at 37°C, *C. perfringens* adhered to a surface and formed a flat, thin biofilm referred to as adhered biofilm (39). This formation required AbrB, a global repressor, and PilA2, which encodes a component of type IV pili (TFP). However, at 25°C, *C. perfringens* did not adhere but produced a threadlike extracellular matrix, forming a viscous, thick biofilm, referred to as pellicle

biofilm. This formation required the sporulation master regulator, Spo0A, and the toxin regulator, CtrAB, and was shown to be enhanced in the absence of AbrB (39). In general, multi-species biofilms were shown to be more tolerant to disinfection than single species biofilms (40, 41). In contrast, Behnke *et al.* (2012) demonstrated that *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilm with *Burkholderia cepacia* was less tolerant to disinfection than their mono-species counterparts (42). This could be due to antagonist interactions between species composing the biofilm, with the production of antimicrobial compounds such as toxins, bacteriolytic enzymes, bacteriophages, antibiotics or bacteriocins (43). Interestingly, potassium monopersulfate was found to be very effective against mono and dual-species biofilms. This has been previously reported for *Salmonella* mono-species biofilms (44) but to our knowledge, this is the first description of such effectiveness against mixed biofilms. Also, dual-species biofilms formed with *C. perfringens* and *E. coli* were more tolerant to hydrogen peroxide and glutaraldehyde when incubated in anaerobic conditions compared to these biofilms formed in aerobic conditions. It was shown that bacterial cells grown in anaerobic environment were more susceptible to disinfection than anaerobically grown cells (45). However, to our knowledge, no data is available on susceptibility differences between mono-species and mixed biofilms grown aerobically or anaerobically. Differences observed could be due to synergistic interactions between the two microorganisms during the anaerobic growth but this hypothesis warrants further investigations.

In conclusion, this study reports for the first time that biofilms of *C. perfringens* can protect the embedded bacteria from toxic molecules such as disinfectants but that significant reductions of cells viabilities in biofilm can be achieved *in vitro* with sodium hypochlorite or potassium monopersulfate.

## **Acknowledgements**

This work was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M. Archambault (RGPIN-191461).

## References

1. **Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D.** 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2nd edition, Elsevier.
2. **Petit L, Gibert M, Popoff MR.** 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* **7**:104-110.
3. **Myers GS, Rasko DA, Cheung JK, Ravel J, Seshadri R, DeBoy RT, Ren Q, Varga J, Awad MM, Brinkac LM, Daugherty SC, Haft DH, Dodson RJ, Madupu R, Nelson WC, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Khouri H, Dimitrov GI, Watkins KL, Mulligan S, Benton J, Radune D, Fisher DJ, Atkins HS, Hiscox T, Jost BH, Billington SJ, Songer JG, McClane BA, Titball RW, Rood JI, Melville SB, Paulsen IT.** 2006. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res* **16**:1031-1040.
4. **Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, Fazil A, Nesbitt A, Marshall B.** 2013. Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006. *Foodborne pathogens and disease*.
5. **Sarker MR, Carman RJ, McClane BA.** 1999. Inactivation of the gene (*cpe*) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two *cpe*-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol Microbiol* **33**:946-958.
6. **Songer JG.** 2010. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol* **140**:399-404.
7. **Stanley D, Wu SB, Rodgers N, Swick RA, Moore RJ.** 2014. Differential Responses of Cecal Microbiota to Fishmeal, *Eimeria* and *Clostridium perfringens* in a Necrotic Enteritis Challenge Model in Chickens. *PLoS One* **9**:e104739.
8. **Jefferson KK.** 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* **236**:163-173.
9. **Davey ME, O'Toole G A.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:847-867.



10. **Costerton JW.** 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**:217-221; discussion 237-219.
11. **Davies D.** 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* **2**:114-122.
12. **Hall-Stoodley L, Stoodley P.** 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**:1034-1043.
13. **Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F.** 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* **27**:1017-1032.
14. **Varga JJ, Nguyen V, O'Brien DK, Rodgers K, Walker RA, Melville SB.** 2006. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Mol Microbiol* **62**:680-694.
15. **Charlebois A, Jacques M, Archambault M.** 2014. Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. *Frontiers in microbiology* **5**:183.
16. **Pantaleon V, Bouttier S, Soavelomandroso AP, Janoir C, Candela T.** 2014. Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe*.
17. **Leung JW, Liu Y, Chan RC, Tang Y, Mina Y, Cheng AF, Silva J, Jr.** 2000. Early attachment of anaerobic bacteria may play an important role in biliary stent blockage. *Gastrointestinal endoscopy* **52**:725-729.
18. **Charlebois A, Jalbert LA, Harel J, Masson L, Archambault M.** 2012. Characterization of Genes Encoding for Acquired Bacitracin Resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One* **7**:e44449.
19. **Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F.** 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **115**:891-899.
20. **Duncan CL, Strong DH.** 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Applied microbiology* **16**:82-89.
21. **Pereira MO, Vieira MJ, Beleza VM, Melo LF.** 2001. Comparison of two biocides--carbamate and glutaraldehyde--in the control of fouling in pulp and paper industry. *Environmental technology* **22**:781-790.

22. **Grobe KJ, Zahller J, Stewart PS.** 2002. Role of dose concentration in biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **29**:10-15.
23. **Vilain S, Cosette P, Zimmerlin I, Dupont JP, Junter GA, Jouenne T.** 2004. Biofilm proteome: homogeneity or versatility? *Journal of proteome research* **3**:132-136.
24. **Wang R, Bono JL, Kalchayanand N, Shackelford S, Harhay DM.** 2012. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *Journal of food protection* **75**:1418-1428.
25. **Davison WM, Pitts B, Stewart PS.** 2010. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2920-2927.
26. **Saravanan P, Nancharaiah YV, Venugopalan VP, Rao TS, Jayachandran S.** 2006. Biofilm formation by *Pseudoalteromonas ruthenica* and its removal by chlorine. *Biofouling* **22**:371-381.
27. **Lomander A, Schreuders P, Russek-Cohen E, Ali L.** 2004. Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. *Bioresource technology* **94**:275-283.
28. **Stewart PS, Roe F, Rayner J, Elkins JG, Lewandowski Z, Ochsner UA, Hassett DJ.** 2000. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **66**:836-838.
29. **Stewart PS, Rayner J, Roe F, Rees WM.** 2001. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol* **91**:525-532.
30. **Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C.** 2002. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1469-1474.
31. **Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C.** 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**:450-464.

32. **Sauer K, Camper AK.** 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**:6579-6589.
33. **Stewart PS, Franklin MJ.** 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**:199-210.
34. **Sabev HA, Robson GD, Handley PS.** 2006. Influence of starvation, surface attachment and biofilm growth on the biocide susceptibility of the biodeteriogenic yeast *Aureobasidium pullulans*. *J Appl Microbiol* **101**:319-330.
35. **Taylor RH, Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW.** 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* **66**:1702-1705.
36. **Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H.** 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **7**:981-994.
37. **Lewis K.** 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry. Biokhimiia* **70**:267-274.
38. **Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R.** 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods* **82**:64-70.
39. **Obana N, Nakamura K, Nomura N.** 2014. A sporulation factor is involved in the morphological change of *Clostridium perfringens* biofilms in response to temperature. *J Bacteriol* **196**:1540-1550.
40. **Simoës M, Simoës LC, Vieira MJ.** 2009. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res* **43**:229-237.
41. **Luppens SB, Kara D, Bandounas L, Jonker MJ, Wittink FR, Bruning O, Breit TM, Ten Cate JM, Crielaard W.** 2008. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. *Oral microbiology and immunology* **23**:183-189.

42. **Behnke S, Camper AK.** 2012. Chlorine dioxide disinfection of single and dual species biofilms, detached biofilm and planktonic cells. *Biofouling* **28**:635-647.
43. **Tait K, Sutherland IW.** 2002. Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *J Appl Microbiol* **93**:345-352.
44. **Moretro T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S.** 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J Appl Microbiol* **106**:1005-1012.
45. **Kim J, Hahn JS, Franklin MJ, Stewart PS, Yoon J.** 2009. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* **63**:129-135.

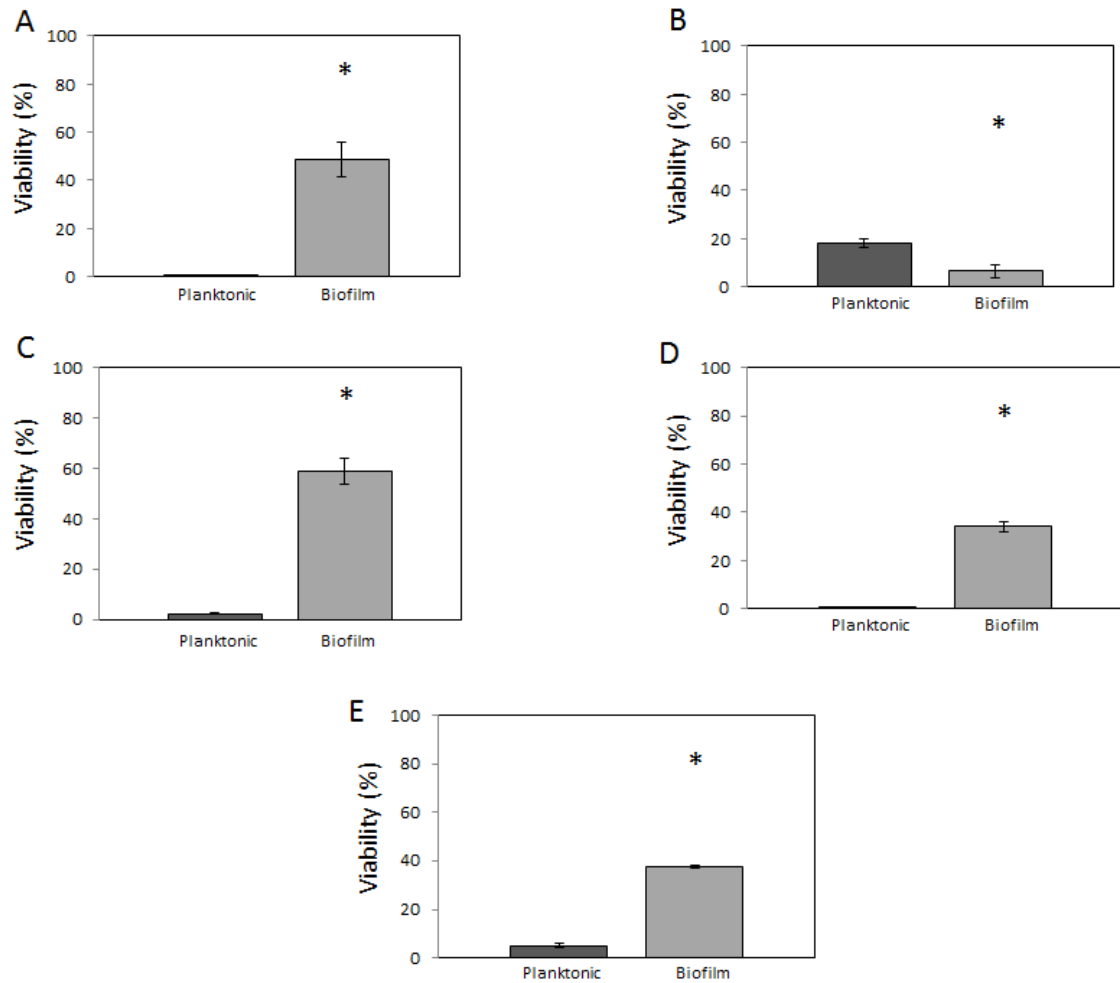
1 **Table 1: Bacterial isolates used in this study.**

2

Bacteria	Origin	Strains	Biofilm formation	Source
<i>Clostridium perfringens</i>	Commensal	c2614_B	Weak	Charlebois <i>et al.</i> (2014) (15)
		c2628_A	Weak	
		c2643_A	Weak	
		c2645_A	Weak	
		c2647_A	Weak	
		c2649_A	Weak	
		c2650_A	Weak	
		c2651_A	Weak	
		c2652_A	Weak	
		c2654_A	Weak	
		c2662_A	Weak	
		c2725_A	Weak	
		C3039_A	Weak	
		C3080_A	Weak	
C3143_A	No			
	Clinical	DUR-109-L469	Moderate	This study
		DUR-109-B468	Moderate	
		DUR-106-E170	Weak	

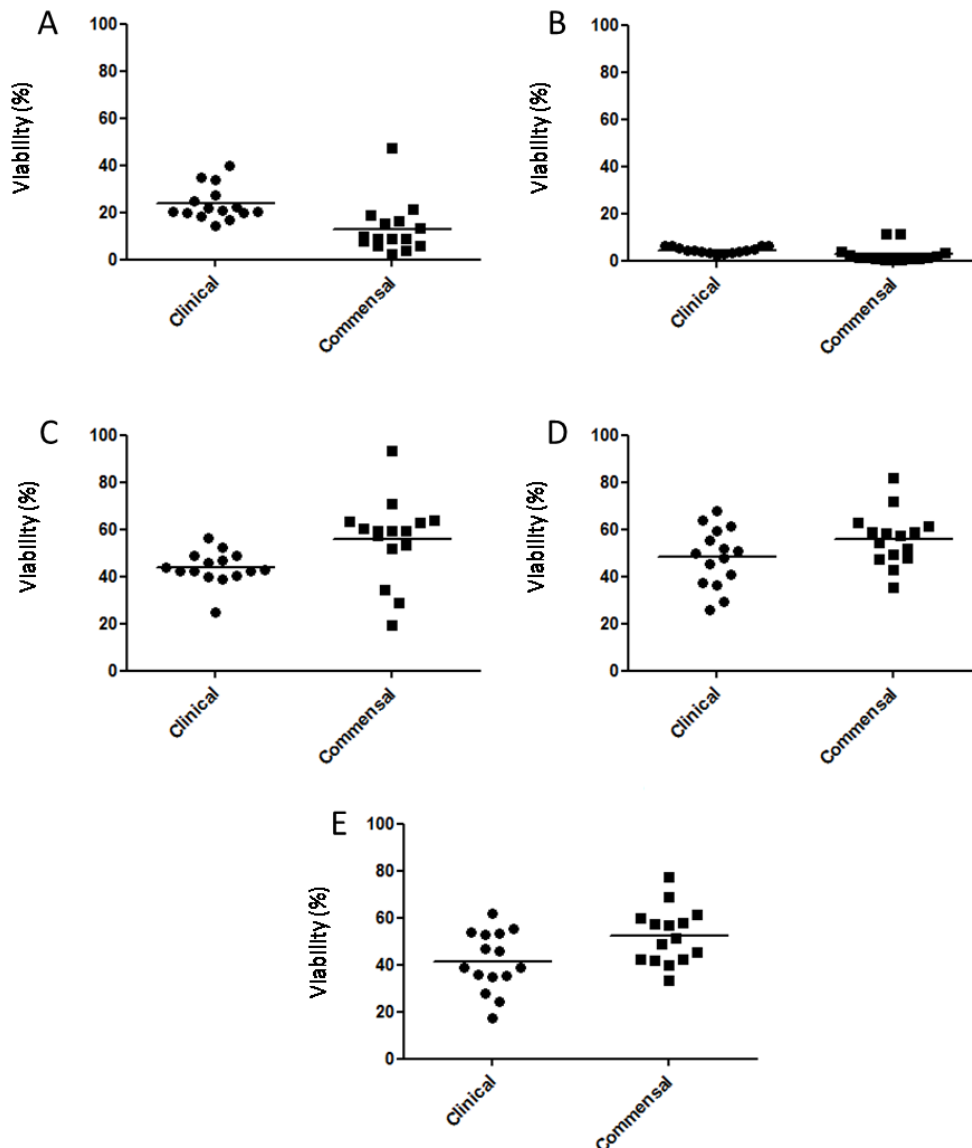
		DUR-106-D170	Weak	
		DUR-106-C170	Weak	
		DUR-106-B170	Weak	
		DUR-106-A170	Weak	
		FBC-3200A-5	High	
		FBC-3200A-3	Weak	
		FBC-3200L-410	Weak	
		FBC-3200K-410	Weak	
		FBC-3200J-410	Weak	
		FBC-3200E-176	Weak	
		FBC-3200D	High	
		FBC-3200B	Moderate	
		ATCC13124	Weak	
<i>Escherichia coli</i>	Clinical	EcL 17606	Moderate	This study
<i>Staphylococcus aureus</i>	Commensal	E452b3	High	This study

**Figure 1: Viability of *C. perfringens* ATCC 13124 planktonic cells compared to cells in biofilm following exposure to disinfectants.**



Planktonic cultures and 6-days-old biofilms of *C. perfringens* ATCC 13124 exposed to [A] potassium monopersulfate (1 %), [B] sodium hypochlorite (0.27 %), [C] quaternary ammonium chloride (1 %), [D] hydrogen peroxide (10 %), or [E] glutaraldehyde (2 %) for 10 minutes. Results are expressed as percentages of the control not exposed to disinfectants. Differences in survival of planktonic cells versus biofilm were compared using Student's *t*-test. \*,  $p < 0.05$ . The error bars represent standard deviations. Results presented are the mean of triplicates from two independent experiments for the strain *C. perfringens* ATCC 13124. All other strains have similar graphic patterns.

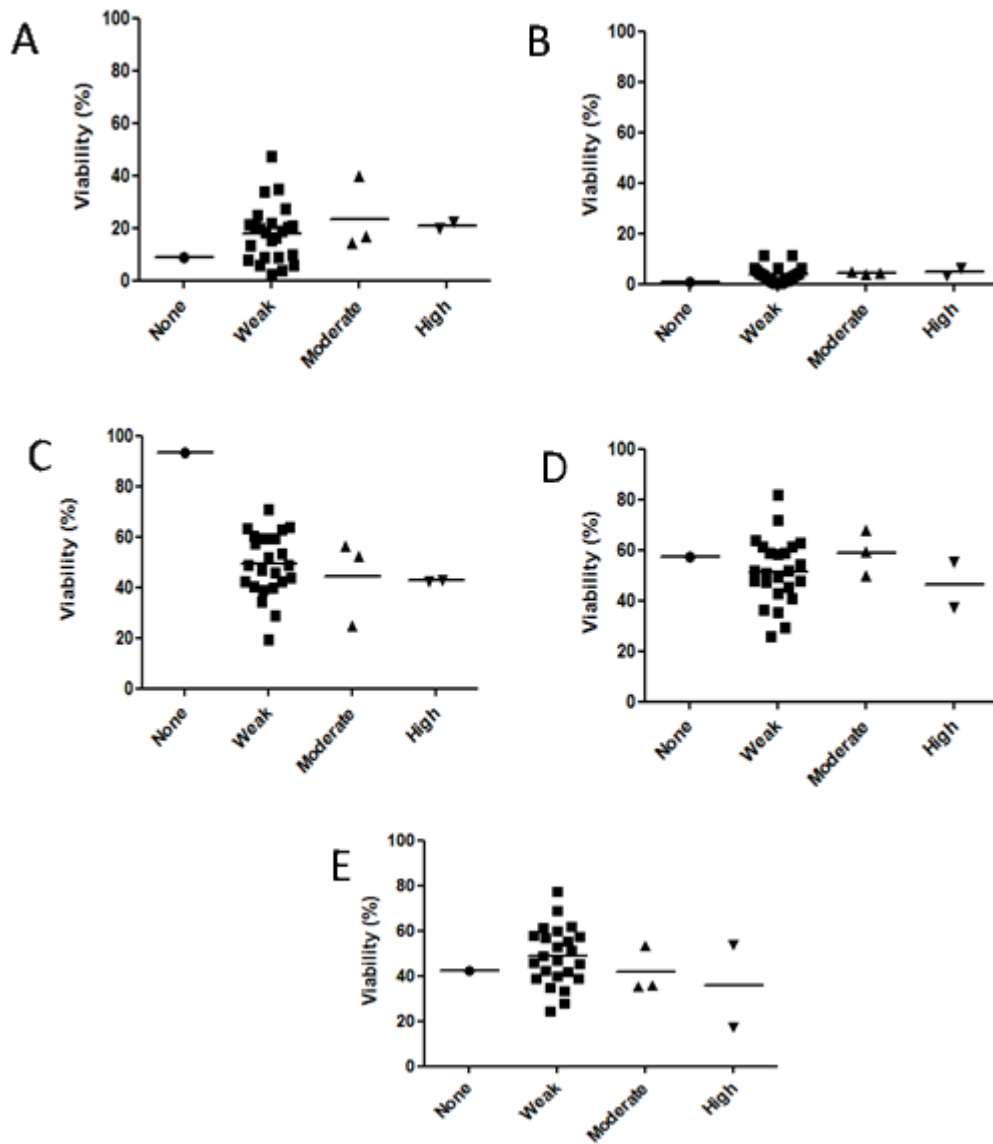
**Figure 2: Viability of *C. perfringens* isolates of clinical and commensal origins in biofilm following exposure to disinfectants.**



Viability of 6-days-old biofilms of *C. perfringens* strains exposed to [A] potassium monopersulfate (1 %), [B] sodium hypochlorite (0.27 %), [C] quaternary ammonium chloride (1 %), [D] hydrogen peroxide (10 %) or [E] gluteraldehyde (2 %) for 10 minutes. Results are expressed as percentages of the control not exposed to disinfectants. Differences in survival between clinical and commensal strains were compared using Student's *t*-test. Each dot represents the mean of the triplicates for each strain. The bars represent the mean values of each group.

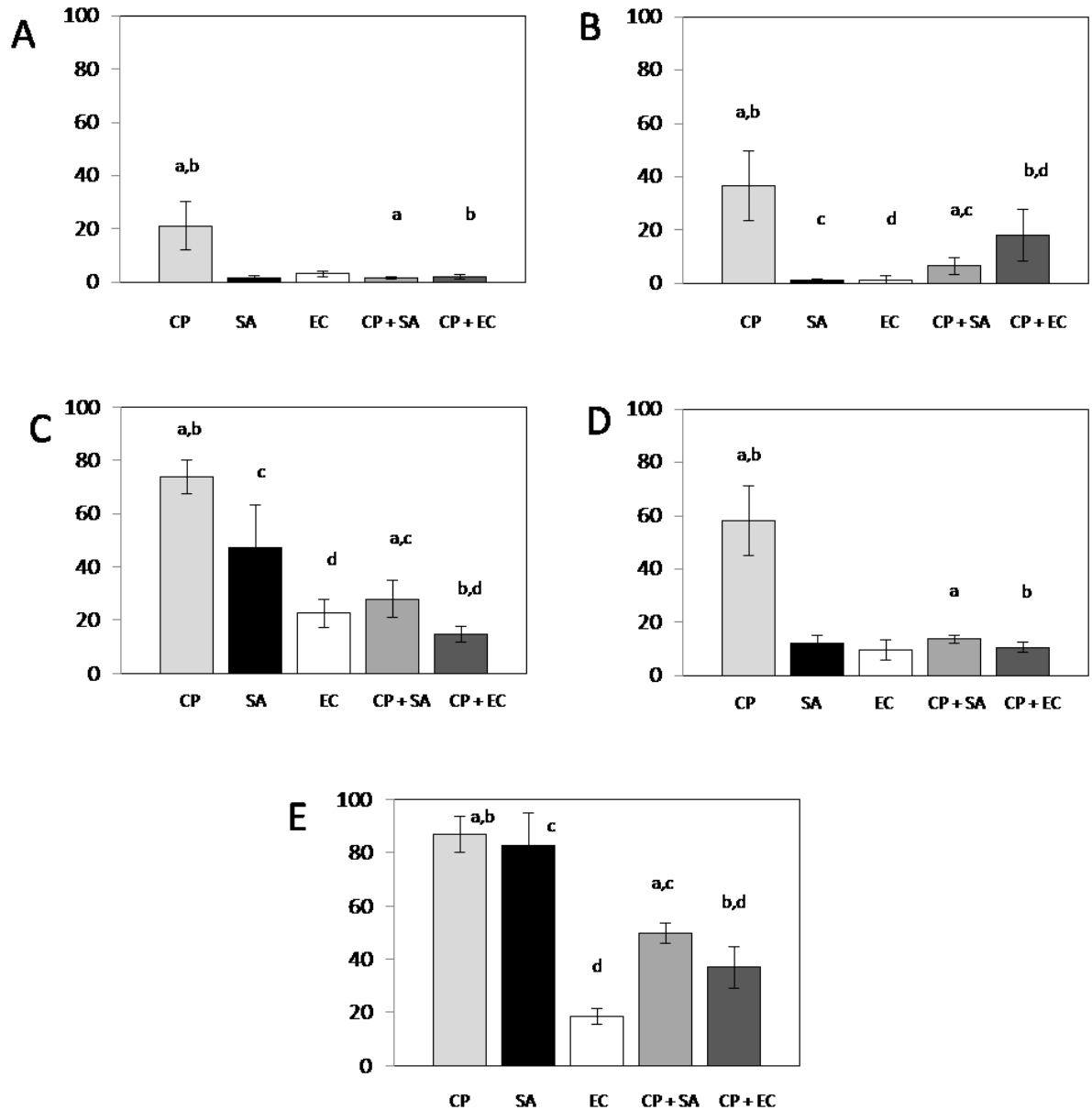


**Figure 3: Differences in survival between none, weak, moderate or high biofilm producers following exposure to disinfectants.**



Viability of 6-days-old biofilms of *C. perfringens* strains exposed to [A] potassium monopersulfate (1 %), [B] sodium hypochlorite (0.27 %), [C] quaternary ammonium chloride (1 %), [D] hydrogen peroxide (10 %) or [E] gluteraldehyde (2 %) for 10 minutes. Results are expressed as percentages of the control not exposed to disinfectants. Differences in survival between none, weak, moderate or high biofilm producers groups were compared using Student's *t*-test. Each dot represents the mean of the triplicates for each strain. The bars represent the mean values of each group.

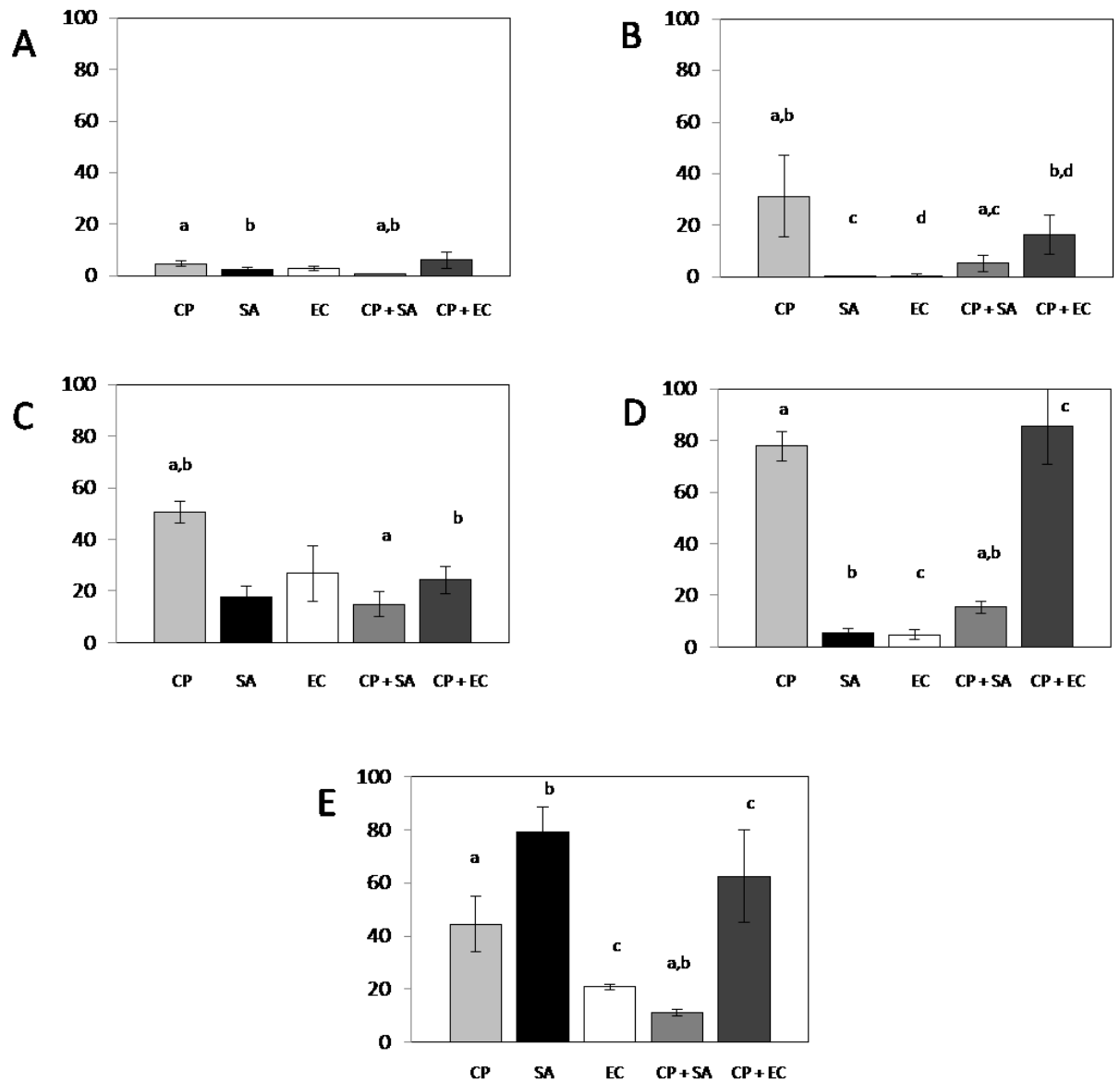
**Figure 4: Percentages of total viability mean of mono-species biofilms grown in aerobic conditions compared to dual-species biofilms following exposure to disinfectants.**



*C. perfringens*, *S. aureus* and *E. coli* 24h-old mono-species and dual-species biofilms were exposed to [A] potassium monopersulfate (1 %), [B] sodium hypochlorite (0.27 %), [C] quaternary ammonium chloride (1 %), [D] hydrogen peroxide (10 %) or [E] glutaraldehyde (2 %) for 10 min. Results are expressed as percentages of the control not exposed to disinfectant. Differences in survival between mono-species and dual-

species biofilms were compared using Student's *t*-test. <sup>a,b,c,d</sup>,  $p < 0.05$ . The error bars represent standard deviations. CP: *C. perfringens* ATCC 13124; SA: *S. aureus* E452b3; EC: *E. coli* EcL17606.

**Figure 5: Percentages of total viability mean of mono-species biofilms grown in anaerobic conditions compared to dual-species biofilms following exposure to disinfectants.**



*C. perfringens*, *S. aureus* and *E. coli* 24h-old mono-species and dual-species biofilms were exposed to [A] potassium monopersulfate (1 %), [B] sodium hypochlorite (0.27 %), [C] quaternary ammonium chloride (1 %), [D] hydrogen peroxide (10 %) or [E] gluteraldehyde (2 %) for 10 min. Results are expressed as percentages of the control not exposed to disinfectant. Differences in survival between mono-species and dual-species biofilms were compared using Student's *t*-test. <sup>a,b,c,d</sup>,  $p < 0.05$ . The error bars represent standard deviations. CP: *C. perfringens* ATCC 13124; SA: *S. aureus* E452b3; EC: *E. coli* EcL17606.

Article 4

**“Comparative transcriptomic analysis of  
*Clostridium perfringens* biofilm and planktonic  
cells”**

Audrey Charlebois<sup>1</sup>, Mario Jacques<sup>1</sup> and Marie Archambault<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pathologie et Microbiologie, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire (CRIPA), University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada;

\*Corresponding author

Running title: Gene expression in *Clostridium perfringens* biofilms

En préparation pour : Journal PLoS One

Détail sur le rôle de la candidate dans la conception de l'article : J'ai effectué toutes les manipulations à l'exception du séquençage Illumina. J'ai rédigé et révisé l'article dans son ensemble pour la publication.

## Abstract

*Clostridium perfringens* is an opportunistic pathogen that can cause food poisoning in humans and various enterotoxemia in animal species. Recently, *C. perfringens* was shown to form biofilms, a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced extracellular matrix. However, very little is known on the subject and no information is available on gene expression in *C. perfringens* biofilms. To gain insights into the differences between free-living *C. perfringens* cells and those in biofilms, we used RNA sequencing. Despite the striking differences in lifestyles, only about 7.9 % of genes showed differential expression in the two growth modes; about 3.2 % of genes were up-regulated and about 4.7 % were down-regulated in biofilms. We show that 238 genes were significantly differentially expressed between biofilms and planktonic cells from the supernatant of biofilms. Genes that were down-regulated in biofilm cells, relative to planktonic cells, included those involved in virulence, energy production, carbohydrate metabolism, fatty acids and amino acids biosynthesis. Genes up-regulated in biofilm cells were mainly involved in oxidative and stress responses, fatty acids and phospholipids biosynthesis. This study provides new insights into the transcriptomic response of *C. perfringens* during biofilm formation.

## Introduction

*C. perfringens* is a gram-positive anaerobic bacterium that causes several important human and animal diseases, primarily as a result of its ability to produce many different toxins [1]. A classification based on the production of four major toxins (alpha, beta, epsilon, and iota) divides the *C. perfringens* into five toxigenic biotypes (A to E) [2]. In humans, *C. perfringens* is responsible for gas gangrene, enteritis necroticans, food poisoning, and antibiotic-associated diarrheas [3]. Currently, *C. perfringens* type A food poisoning is one of the most common causes of foodborne illness in North America [4-6]. This food poisoning is caused by a small group (~5 %) of type A isolates that produce the enterotoxin CPE [7, 8]. In poultry, avian-specific *C. perfringens* strains cause necrotic enteritis, an economically significant poultry disease that costs the global industry over \$2 billion annually in losses and control measures [9]. In some countries, this disease appears to be on the rise because of removal of antibiotic growth promoters [9]. Isolates of animal origin constitute a risk for transmission to humans through the food chain.

Recently, we, and others, have described the formation of biofilms in *C. perfringens* [10, 11]. Biofilms are structured communities of bacterial cells enclosed in a self-produced extracellular polysaccharides (EPS) matrix which provides increased resistance to environmental stresses [12]. It was also shown that type IV pilus dependent gliding motility and the catabolite control protein (CcpA), a key regulator of the response to carbohydrate limitation, were needed for maximal biofilm formation [13]. One of our studies demonstrated that the biofilm formed by *C. perfringens* could protect the cells from an exposure to atmospheric oxygen and to high concentrations of antibiotics and anticoccidial agents [11]. The matrix of these biofilms was shown to be composed of beta-1,4-linked polysaccharides, proteins and extracellular DNA [11]. Recently, it was shown that temperature regulates *C. perfringens* biofilm morphology and that a sporulation master regulator was involved at a particular temperature [14]. It was shown that at 37°C, *C. perfringens* adhered to a surface and formed a flat, thin biofilm referred to as adhered biofilm [14]. This formation required AbrB, a global repressor, and PilA2, which encodes a component of type IV pili (TFP). However, at 25°C, *C. perfringens* did not adhere but produced a

threadlike extracellular matrix, forming a viscous, thick biofilm, referred to as pellicule biofilm. This formation required the sporulation master regulator, Spo0A, and the toxin regulator, CtrAB, and was shown to be enhanced in the absence of AbrB [14].

Biofilms phenotypic adaptations were shown to be associated with the expression of particular genes in response to their environments [15]. During the adhesion step, studies have shown that genes coding flagellar proteins are repressed while other genes coding for EPS and curli are induced [16, 17]. Following the adhesion, bacteria develop into a biofilm with a three-dimensional structure where cells located at the periphery have access to nutrients and oxygen, while those in internal layers have poorer environments containing more metabolic waste elements [15]. It has been stated that this chemical heterogeneity is the source of the physiological heterogeneity [18] where cells with distinctive metabolic rates are present throughout the biofilm, indicating variety in gene expressions. This induces modifications to membrane composition and in defense mechanism expressions leading to an increase in tolerance of bacteria to environmental stresses [19, 20]. Also, it has been reported that a small part of the bacterial population within a biofilm may develop into a highly protected state with drastic resistance and referred to as persisters [21, 22]. They may therefore contribute to protection in the biofilm [21, 22]. In the past decade, the study of the molecular genetics of biofilms was accelerated by the use of DNA microarrays and, more recently, by the use of high-throughput RNA sequencing (RNA-seq) [23]. RNA-seq has been used for transcriptome analysis as an alternative to other transcriptomic techniques due to advantages such as large dynamic range, high technical reproducibility, and because a reference transcriptome is not a requirement [23]. In general, genetic studies have revealed that biofilm formation apparently requires expression of a distinct set of genes that are different from planktonic cells including those related to chemotaxis, motility, EPS biosynthesis and stress response [24-26]. Although *C. perfringens* is known to form biofilms, the genes differentially expressed during the formation of this structure have not yet been described. This study was undertaken to investigate gene expression in *C. perfringens* biofilms.



## **Materials and methods**

### **Bacterial growth conditions and biofilm formation**

*Clostridium perfringens* strain CP4 has been previously described [27] and was used in this study. It is of poultry origin and has been isolated from a clinical case of necrotic enteritis. Thawed isolate was grown on Columbia agar with 5% sheep blood (Oxoid, Nepean, Ontario, Canada) and then incubated in anaerobic condition at 35°C. Biofilm was cultured as described earlier with few modifications [11]. Briefly, overnight blood agar cultures of *C. perfringens* were resuspended at a density of 0.5 MacFarland in Tryptic soy broth (TSB) (BD, Mississauga, Ontario, Canada) supplemented with 10 mM of filter-sterilized glucose (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Five mL of culture were added in 6-well polystyrene tissue culture plates and incubated anaerobically at 44°C for 24 h. After incubation, medium containing planktonic cells were harvested (planktonic cells from a biofilm). Plates were washed once with MiliQ water and attached cells were resuspended in 2 mL of sterile PBS (biofilm). For planktonic cells, 5 mL of TSB supplemented with 10 mM of filter-sterilized glucose was inoculated and incubated anaerobically at 44°C for 24 h. After incubation, planktonic cells were harvested (planktonic). All growth modes were done in triplicates and three independent experiments were performed.

### **RNA extraction and library construction**

Bacterial total RNA from *C. perfringens* was extracted with the Trizol Max Bacterial Enhancement kit (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) as described by the manufacturer. RNA was further purified and concentrated with an RNeasy mini kit (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada). RNA integrity and purity was verified by Experion (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) and Nanodrop spectrophotometer, respectively. After removing rRNA by using Ambion MICROBExpress Kit (Invitrogen), mRNA was used to generate the cDNA library according to TruSeq RNA Sample Prep Kit protocol (Illumina, San Diego, CA, USA), which was then sequenced using the HiSeq 2000 system (Illumina).

## **Transcriptome analysis**

Data generated from sequencing were stored in the standard FASTQ format for use as input for subsequent analysis. RNA-Seq analysis of sequence data generated was undertaken using the CLC Genomics Workbench (version 7.0.4, CLC Bio, Boston, MA, USA). Experimental inputs for the analysis included the previously described FASTQ files containing sequenced reads for each experimental conditions, and the Genbank files containing the complete sequences of *C. perfringens* strain ATCC 13124, strain 13, strain SM101 and two pathogenicity loci associated with necrotic enteritis (NELoc-1 and -3) from strain CP4 [28]. Sequenced reads generated for each of the three experimental conditions (planktonic, planktonic cells from a biofilm and biofilm) were mapped against the reference genomes in order to quantify gene expression levels of the bacterium for each experimental condition. Mapped read count normalization was applied to the data based on the number of reads per kilobase of coding sequence per million mapped reads (RPKM) [29]. In order to identify genes differentially expressed, a *t*-test was performed with a false discovery rate (FDR) correction. All three experimental conditions were compared to each other. A gene was considered as differentially expressed when the *p*-value was < 0.01.

## **Real-time quantitative RT-PCR**

Selected transcriptomic results were verified by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR), using the SsoFast EvaGreen Supermix RT-PCR Kit (Bio-Rad). Primers (Table 1) were PCR tested before proceeding to qRT-PCR analysis to ensure that amplification with these primers resulted in single amplicon of the anticipated size. Five genes were selected for analysis (Table 1). Reactions were performed with a 16-place Cepheid Smart Cycler® System in a total volume of 25 µl consisting of 10 µL 2X SsoFast EvaGreen PCR Master Mix, 5 pmol of forward and reverse primers, and 2 µL of cDNA. PCR conditions included initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 56°C, 30 s at 72°C and final extension of 2 min at 72°C followed by melting curve analysis from 65–95°C. Negative controls containing nuclease-free water instead of RNA were run concomitantly to confirm that the samples were free from contamination. Relative expression of each gene as determined by qRT-PCR was normalized to that of the *rpoA* gene which showed a

stable level of expression throughout the different experiments (data not shown). Quantitative measures were obtained using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. Three biological and three technical replicates were performed.

## Results

### RNA sequencing analysis

#### *Biofilms vs planktonic cells from a biofilm*

RNA sequencing analysis identified 238 genes that were significantly differentially expressed in the two growth modes (Tables 2 and 3). Functional group analysis categorized 50 of these genes as unknown, unclassified or as hypothetical proteins. Of all the protein coding genes, 97 were up-regulated (Table 2) and 141 were down-regulated in biofilms (Table 3). Genes differentially regulated were grouped in many functional categories (Fig. 1). Some of the regulated genes are known to be involved in virulence, transport, metabolism, biosynthetic processes, transcriptional regulation, SOS and oxidative stress responses, transcription, translation and DNA metabolism (Tables 2 and 3). More specifically, virulence genes encoding alpha-clostripain, collagenase, necrotic enteritis toxin B and enterotoxin were down-regulated in biofilms (Table 3). In contrast, three genes encoding hemolysins were up-regulated in biofilms (Table 2). Many genes involved in oxidative stress resistance such as genes encoding rubredoxin/rubrerhythrin, alkyl hydroperoxide reductase and haemoglobin were up-regulated in *C. perfringens* biofilms (Table 2). Genes encoding for several other enzymes from the general stress response were also up-regulated (*hrcA*, *lexA* and *recA*) (Table 2). A few genes involved in redox reactions were differentially expressed during biofilm formation. CPF\_2866 was up-regulated whereas CPF\_1076 and *hydA* were down-regulated (Table 3).

Transcriptomic analysis showed that several genes involved in biosynthesis metabolism of carbohydrate, pyruvate and acetate, fatty acids and phospholipids were up-regulated in biofilm cells (Table 2). Data also showed a down-regulation of genes encoding proteins involved in chromosome replication such as 3 helicases (*pcrA*, CPF\_0426 and CPF\_0580), single-stranded binding protein Ssb and the DNA polymerase III beta subunit DnaN (Table 3). Similarly, many genes involved in energy production, translation, carbohydrate metabolism, fatty acids and amino acids biosynthesis were also down-regulated (Table 3). Other genes such as *sigG* and *spoIIQ*, involved in the sporulation process, were found to be up-regulated in biofilms

(Table 2). On the contrary, the quorum sensing gene *luxS* was down-regulated in biofilms along with genes involved in cell division and protein excretions (Table 3).

### ***Biofilms vs planktonic cells from a stationary phase culture***

Another set of comparison was performed between biofilms vs planktonic cells from a stationary phase culture. RNA sequencing analysis identified 107 genes that were significantly differentially expressed in these two growth modes. Genes were divided into the same functional categories as mentioned above. Of all the protein coding genes, only 49 were up-regulated and 58 were down-regulated in biofilms. These results can be found in supplemental materials in Tables S1 and S2.

### ***Planktonic cells from a biofilms vs planktonic cells from a stationary phase culture***

Only 10 genes were found to be differentially expressed between the planktonic cells found in the supernatant of the biofilm and the planktonic cells from a stationary phase culture. Of those, 5 were up-regulated and 5 were down-regulated in biofilms (Tables S3 and S4). These genes were involved in translation, metabolism processes and stress responses (Tables S3 and S4).

### ***Venn diagram***

Venn diagram analysis of the comparison groups revealed that no differentially expressed gene was shared between all three comparison groups (Fig. 2, intersection of the three circles). Also, many genes were uniquely expressed in each comparison growth modes (Fig 2). When comparing the biofilms vs planktonic cells from a biofilm and the biofilms vs planktonic cells groups, seventy genes were found to be shared by both comparison groups (27 up-regulated and 43 down-regulated) (Fig. 2). No gene was shared between the biofilms vs planktonic cells from a biofilm group and the planktonic cells from a biofilms vs planktonic cells group. However, two repressed genes were shared between the biofilms vs planktonic cells group and the planktonic cells from a biofilm vs planktonic cells group (Fig. 2).

### **Validation by quantitative RT-PCR**

To validate the RNA sequencing results, quantitative RT-PCR was performed on 10 randomly selected differentially expressed genes. Fold-changes in gene expressions

were calculated after normalization of each gene with the constitutively expressed gene *rpoA*. There was a good correlation between the expression ratios determined by both methods (Fig. 3).

## Discussion

In the present study, the biofilm transcriptome of *C. perfringens* CP4 was analyzed for the first time with RNA sequencing. This analysis showed that only about 7.9 % of genes ( $n = 238$ ) were significantly differentially expressed in biofilms and planktonic biofilms. Overall, about 3.2 % of genes were activated and about 4.7 % were repressed in biofilms. Our results show that gene expression in biofilm cells is similar to that in free-living cells but there are a small number of significant differences. In this study, several genes involved in biosynthesis metabolism of carbohydrate, pyruvate and acetate were up-regulated in biofilms. This induction of exopolysaccharide biosynthesis during biofilm formation has been observed in other studies [26, 30]. The major components of the extracellular polymeric substances are exopolysaccharides [31]. Several EPS are homopolysaccharides but most of them are heteropolysaccharides that consist of a mixture of neutral and charged sugar residues. They can also contain organic or inorganic substituents like pyruvate, acetate, succinate or, rarely, sulphate [31, 32]. EPS have been shown to be required for the initial attachment to a surface, for the structural development of mature biofilms and is considered to be the key component that determines the physico-chemical and biological properties of biofilms [26].

Most of the genes involved in fatty acids and amino acids biosynthesis, energy production, translation, carbohydrate metabolism, and in chromosome replication were repressed in biofilms as well as genes involved in cell division and protein excretions. Only a few genes involved in fatty acids and phospholipids biosynthesis were activated in biofilms. These results suggest a slowed cell replication and growth rate in biofilms. This is in agreement with other studies on the transcriptomic of biofilms [25, 26, 33]. The slower growth rate of cells in biofilms has been previously attributed to restricted penetration of nutrients [25].

Several genes involved in oxidative stress resistance and in the general stress response were up-regulated in biofilms. Increased expression of oxidative stress genes have previously been reported in *Escherichia coli* biofilms [34]. Moreover, increased protein levels of superoxide dismutase and alkyl hydroperoxide reductase

in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm have been observed [35]. In *Neisseria gonorrhoeae*, mechanisms for oxidative stress tolerance appear to be required in order to sustain robust biofilms [36]. More recently, the oxidative stress response sensor OxyR has been associated with biofilm development in many microorganisms [37]. It has been proposed that the up-regulation of oxidative stress-induced biofilm formation in the host might provide bacteria with a defense strategy [37] but the associated mechanisms are still not fully understood. Both oxidative stress resistance and general stress response might be important for the development of biofilms in *C. perfringens* because many genes involved in these processes were activated in this study. Moreover, in previous studies, it was shown that *C. perfringens* cells in biofilms were more tolerant to atmospheric oxygen and to hydrogen peroxide [11](Charlebois *et al.*, article in preparation).

Genes encoding alpha-clostripain, collagenase, necrotic enteritis toxin B and enterotoxins were repressed in biofilms. These results are in agreement with what was previously observed in other studies where toxins were down-regulated in biofilms [38, 39]. The present study also demonstrated that genes encoding hemolysins were activated in *C. perfringens* biofilms. *Staphylococcus aureus* mutants defective in alpha-hemolysin production failed to form biofilms under both static and flow conditions, indicating a role in biofilm formation [40]. This phenotype seems to be associated to an apparent defect in cell-to-cell interactions [40]. Hemolysins of *Streptococcus suis* and enterococci have also been associated as key elements in biofilms [41, 42]. In addition to toxin genes, a few antimicrobial resistance genes were also differentially expressed in this study. A tetracycline resistance gene (CPF-1490) was upregulated in *C. perfringens* biofilms whereas genes coding for a penicillin-binding protein (CPF-0340) and a metallo-beta-lactamase (CPF-2932) were down-regulated in the same condition. The induction or repression of particular antimicrobial resistance genes in biofilms has not yet been clearly demonstrated and further research is necessary to determine if this phenomenon plays a role in biofilms formation and resistance.

In this study, many genes involved in iron acquisition were activated in biofilms. In *P. aeruginosa*, it was found that iron serves as a signal in biofilm development [43].



In their study, mutants that were not able to obtain iron through the high-affinity pyoverdine iron acquisition system formed thin biofilms similar to those formed by their parent strain under low iron conditions. Genes involved in iron acquisition were also found to be up-regulated in *S. aureus* and *Acinetobacter baumannii* biofilms [44, 45].

The genes *sigG* and *spoIIQ* of *C. perfringens* were both activated in biofilms. The SpoIIQ protein is located in the membrane of the forespore and is involved in the engulfment process. This protein is also central to the formation of a channel linking the mother cell to the forespore [46]. As for SigG, it regulates gene expression in the forespore [47]. Previous studies have reported on genes involvement in sporulation in association with biofilm formation. In *C. perfringens*, Spo0A, a master regulator of sporulation of Gram-positive, has been shown to be required for non-adherent pellicle formation at 25°C [14]. In *C. difficile*, Spo0A was involved in biofilm formation at 37°C [48]. Similarly, in *Bacillus subtilis*, a *spo0A* mutant was impaired for sporulation and biofilm formation [49]. Also, a *sleC* mutant was shown to disturb the biofilm formation of *C. perfringens* and *C. difficile* [50, 51]. SleC is a protein involved in the spore germination process, especially in the cortex lysis [52, 53]. In this study, no significant difference was observed in the expression of *sleC* between biofilms and planktonic cells. However, it would be interesting to study the involvement of *sigG* and *spoIIQ* genes in the biofilm formation process in *C. perfringens*.

In this study, the quorum sensing gene *luxS* was down-regulated in biofilms. This repression of *luxS* was associated with a down-regulation of genes encoding toxins. LuxS of *C. perfringens* has been previously reported as an activator of toxin production [54]. In the present study, *luxS* was more expressed in planktonic biofilms than in biofilms. In *Staphylococcus epidermidis*, *luxS* was shown to repress biofilm formation through a cell-cell signaling mechanism based on autoinducer 2 secretion [55]. However, in many studies, *luxS* has been linked to biofilm formation [50, 55-57]. A *C. difficile luxS* mutant was found to be unable to form a bacterial monolayer on glass surface, indicating the importance of this gene in the first steps of biofilm

formation [50]. A study with a *C. perfringens luxS* mutant could bring more information on the role of this gene in the biofilm formation.

In addition to biofilms vs planktonic biofilm comparison group, two other comparison groups were analysed: biofilm vs planktonic and planktonic biofilm vs planktonic. Overall, more genes were differentially expressed between biofilms and planktonic biofilms than between biofilms and planktonic cells. It is tempting to speculate that planktonic biofilm cells and biofilm cells are cross-talking, affecting the transcription of many genes, but this hypothesis needs further investigation.

In conclusion, this study provides new insights into the genes differentially expressed during biofilm formation in *C. perfringens*. Genes involved in virulence, energy production, carbohydrate metabolism, fatty acids and amino acids biosynthesis were down-regulated whereas genes involved in oxidative and stress responses, fatty acids and phospholipids biosynthesis were activated. Moreover, it was proposed that oxidative stress resistance and the general stress response might be important for the development of biofilms in *C. perfringens*.

## **Acknowledgements**

This work was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M. Archambault (RGPIN-191461). We thank Dr Brian Boyle for his technical support for the RNA extraction and the RNA sequencing analysis.

## References

1. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D, editors. *Clinical Veterinary Microbiology*. second ed. London: Mosby elsevier; 2013.
2. Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*. 1999;7(3):104-10. PubMed PMID: 10203838.
3. Myers GS, Rasko DA, Cheung JK, Ravel J, Seshadri R, DeBoy RT, *et al*. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res*. 2006;16(8):1031-40. PubMed PMID: 16825665.
4. Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, Fazil A, *et al*. Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006. *Foodborne pathogens and disease*. 2013. Epub 2013/05/11. doi: 10.1089/fpd.2012.1389. PubMed PMID: 23659355.
5. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, *et al*. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):7-15. doi: 10.3201/eid1701.091101p1. PubMed PMID: 21192848; PubMed Central PMCID: PMC3375761.
6. Scallan E, Hoekstra RM, Mahon BE, Jones TF, Griffin PM. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiol Infect*. 2015:1-10. doi: 10.1017/S0950268814003185. PubMed PMID: 25633631.
7. Sarker MR, Carman RJ, McClane BA. Inactivation of the gene (*cpe*) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two *cpe*-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol Microbiol*. 1999;33(5):946-58. Epub 1999/09/04. PubMed PMID: 10476029.
8. Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):399-404. PubMed PMID: 19682805.
9. Stanley D, Wu SB, Rodgers N, Swick RA, Moore RJ. Differential Responses of Cecal Microbiota to Fishmeal, *Eimeria* and *Clostridium perfringens* in a Necrotic Enteritis Challenge Model in Chickens. *PLoS One*. 2014;9(8):e104739. Epub 2014/08/29. doi: 10.1371/journal.pone.0104739. PubMed PMID: 25167074; PubMed Central PMCID: PMC4148237.

10. Varga JJ, Nguyen V, O'Brien DK, Rodgers K, Walker RA, Melville SB. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Mol Microbiol.* 2006;62(3):680-94. PubMed PMID: 16999833.
11. Charlebois A, Jacques M, Archambault M. Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. *Frontiers in microbiology.* 2014;5:183. doi: 10.3389/fmicb.2014.00183. PubMed PMID: 24795711.
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-22. PubMed PMID: 10334980.
13. Varga JJ, Therit B, Melville SB. Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun.* 2008;76(11):4944-51. Epub 2008/09/04. doi: 10.1128/IAI.00692-08. PubMed PMID: 18765726; PubMed Central PMCID: PMC2573335.
14. Obana N, Nakamura K, Nomura N. A sporulation factor is involved in the morphological change of *Clostridium perfringens* biofilms in response to temperature. *J Bacteriol.* 2014;196(8):1540-50. doi: 10.1128/JB.01444-13. PubMed PMID: 24509316; PubMed Central PMCID: PMC3993371.
15. Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* 2011;27(9):1017-32. Epub 2011/10/21. doi: 10.1080/08927014.2011.626899. PubMed PMID: 22011093.
16. Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol.* 2000;2(4):450-64. PubMed PMID: 11234933.
17. Sauer K, Camper AK. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol.* 2001;183(22):6579-89. doi: 10.1128/JB.183.22.6579-6589.2001. PubMed PMID: 11673428; PubMed Central PMCID: PMC95489.
18. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(3):199-210. doi: 10.1038/nrmicro1838. PubMed PMID: 18264116.

19. Sabev HA, Robson GD, Handley PS. Influence of starvation, surface attachment and biofilm growth on the biocide susceptibility of the biodeteriogenic yeast *Aureobasidium pullulans*. J Appl Microbiol. 2006;101(2):319-30. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03014.x. PubMed PMID: 16882139.
20. Taylor RH, Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. Appl Environ Microbiol. 2000;66(4):1702-5. PubMed PMID: 10742264; PubMed Central PMCID: PMC92045.
21. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol. 2005;7(7):981-94. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00777.x. PubMed PMID: 15946294.
22. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochemistry Biokhimiia. 2005;70(2):267-74. PubMed PMID: 15807669.
23. Carvalhais V, Franca A, Cerca F, Vitorino R, Pier GB, Vilanova M, *et al.* Dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilms: a transcriptomic analysis by RNA-seq. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(6):2585-96. doi: 10.1007/s00253-014-5548-3. PubMed PMID: 24504458.
24. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome Biol. 2003;4(6):219. Epub 2003/06/13. doi: 10.1186/gb-2003-4-6-219. PubMed PMID: 12801407; PubMed Central PMCID: PMC193612.
25. Lo AW, Seers CA, Boyce JD, Dashper SG, Slakeski N, Lissel JP, *et al.* Comparative transcriptomic analysis of *Porphyromonas gingivalis* biofilm and planktonic cells. BMC Microbiol. 2009;9:18. Epub 2009/01/30. doi: 10.1186/1471-2180-9-18. PubMed PMID: 19175941; PubMed Central PMCID: PMC2637884.
26. Zhang W, Culley DE, Nie L, Scholten JC. Comparative transcriptome analysis of *Desulfovibrio vulgaris* grown in planktonic culture and mature biofilm on a steel surface. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;76(2):447-57. Epub 2007/06/16. doi: 10.1007/s00253-007-1014-9. PubMed PMID: 17571259.
27. Thompson DR, Parreira VR, Kulkarni RR, Prescott JF. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. Vet Microbiol. 2006;113(1-2):25-34. Epub 2005/11/18. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.015. PubMed PMID: 16289639.

28. Lepp D, Roxas B, Parreira VR, Marri PR, Rosey EL, Gong J, *et al.* Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. PLoS One. 2010;5(5):e10795. PubMed PMID: 20532244.
29. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature methods. 2008;5(7):621-8. doi: 10.1038/nmeth.1226. PubMed PMID: 18516045.
30. Huse HK, Kwon T, Zlosnik JE, Speert DP, Marcotte EM, Whiteley M. *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of a non-alginate exopolysaccharide during long-term colonization of the cystic fibrosis lung. PLoS One. 2013;8(12):e82621. doi: 10.1371/journal.pone.0082621. PubMed PMID: 24324811; PubMed Central PMCID: PMC3855792.
31. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010;8(9):623-33. PubMed PMID: 20676145.
32. Esperanza Troyano, Sam-Pin Lee, Cho Kyun Rha, Sinskey AJ. Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115SLR. Carbohydrate Polymers. 1996;31(1-2):35-40.
33. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. The Journal of infectious diseases. 2005;191(2):289-98. Epub 2004/12/21. doi: 10.1086/426945. PubMed PMID: 15609240.
34. Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Mol Microbiol. 2003;48(1):253-67. PubMed PMID: 12657059.
35. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol. 2002;184(4):1140-54. PubMed PMID: 11807075; PubMed Central PMCID: PMC134825.
36. Falsetta ML, Steichen CT, McEwan AG, Cho C, Ketterer M, Shao J, *et al.* The Composition and Metabolic Phenotype of *Neisseria gonorrhoeae* Biofilms. Frontiers in microbiology. 2011;2:75. doi: 10.3389/fmicb.2011.00075. PubMed PMID: 21833322; PubMed Central PMCID: PMC3153042.

37. Honma K, Mishima E, Inagaki S, Sharma A. The OxyR homologue in *Tannerella forsythia* regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation. *Microbiology*. 2009;155(Pt 6):1912-22. doi: 10.1099/mic.0.027920-0. PubMed PMID: 19389765; PubMed Central PMCID: PMC2782426.
38. Sanchez CJ, Kumar N, Lizcano A, Shivshankar P, Dunning Hotopp JC, Jorgensen JH, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. *PLoS One*. 2011;6(12):e28738. doi: 10.1371/journal.pone.0028738. PubMed PMID: 22174882; PubMed Central PMCID: PMC3234282.
39. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Gotz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(5):2663-76. Epub 2005/05/05. doi: 10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005. PubMed PMID: 15870358; PubMed Central PMCID: PMC1087559.
40. Caiazza NC, O'Toole GA. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2003;185(10):3214-7. PubMed PMID: 12730182; PubMed Central PMCID: PMC154062.
41. Wang Y, Yi L, Wu Z, Shao J, Liu G, Fan H, *et al.* Comparative proteomic analysis of *Streptococcus suis* biofilms and planktonic cells that identified biofilm infection-related immunogenic proteins. *PLoS One*. 2012;7(4):e33371. doi: 10.1371/journal.pone.0033371. PubMed PMID: 22514606; PubMed Central PMCID: PMC3326019.
42. Tsirikonis G, Maniatis AN, Labrou M, Ntokou E, Michail G, Daponte A, *et al.* Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microb Pathog*. 2012;52(6):336-43. doi: 10.1016/j.micpath.2012.03.003. PubMed PMID: 22445820.
43. Banin E, Vasil ML, Greenberg EP. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11076-81. doi: 10.1073/pnas.0504266102. PubMed PMID: 16043697; PubMed Central PMCID: PMC1182440.
44. Lin MH, Shu JC, Huang HY, Cheng YC. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2012;7(3):e34388. doi:



10.1371/journal.pone.0034388. PubMed PMID: 22479621; PubMed Central PMCID: PMC3313993.

45. Rumbo-Feal S, Gomez MJ, Gayoso C, Alvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, *et al.* Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. PLoS One. 2013;8(8):e72968. doi: 10.1371/journal.pone.0072968. PubMed PMID: 24023660; PubMed Central PMCID: PMC3758355.

46. Saujet L, Pereira FC, Serrano M, Soutourina O, Monot M, Shelyakin PV, *et al.* Genome-wide analysis of cell type-specific gene transcription during spore formation in *Clostridium difficile*. PLoS genetics. 2013;9(10):e1003756. doi: 10.1371/journal.pgen.1003756. PubMed PMID: 24098137; PubMed Central PMCID: PMC3789822.

47. Li J, McClane BA. Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in *Clostridium perfringens* sporulation and enterotoxin synthesis. Infect Immun. 2010;78(10):4286-93. doi: 10.1128/IAI.00528-10. PubMed PMID: 20643850; PubMed Central PMCID: PMC2950359.

48. Dawson LF, Valiente E, Faulds-Pain A, Donahue EH, Wren BW. Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. PLoS One. 2012;7(12):e50527. doi: 10.1371/journal.pone.0050527. PubMed PMID: 23236376; PubMed Central PMCID: PMC3517584.

49. Hamon MA, Lazazzera BA. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2001;42(5):1199-209. PubMed PMID: 11886552.

50. Ethapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, *et al.* Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. J Bacteriol. 2013;195(3):545-55. doi: 10.1128/JB.01980-12. PubMed PMID: 23175653; PubMed Central PMCID: PMC3554014.

51. Pantaleon V, Bouttier S, Soavelomandroso AP, Janoir C, Candela T. Biofilms of *Clostridium* species. Anaerobe. 2014. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.010. PubMed PMID: 25242197.

52. Burns DA, Heap JT, Minton NP. SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt

taurocholate. *J Bacteriol.* 2010;192(3):657-64. doi: 10.1128/JB.01209-09. PubMed PMID: 19933358; PubMed Central PMCID: PMC2812441.

53. Miyata S, Moriyama R, Miyahara N, Makino S. A gene (*sleC*) encoding a spore-cortex-lytic enzyme from *Clostridium perfringens* S40 spores; cloning, sequence analysis and molecular characterization. *Microbiology.* 1995;141 ( Pt 10):2643-50. PubMed PMID: 7582025.

54. Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T. The *luxS* gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol.* 2002;44(1):171-9. Epub 2002/04/23. PubMed PMID: 11967077.

55. Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, *et al.* Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 2006;74(1):488-96. doi: 10.1128/IAI.74.1.488-496.2006. PubMed PMID: 16369005; PubMed Central PMCID: PMC1346618.

56. Vidal JE, Ludewick HP, Kunkel RM, Zahner D, Klugman KP. The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strain D39. *Infect Immun.* 2011;79(10):4050-60. doi: 10.1128/IAI.05186-11. PubMed PMID: 21825061; PubMed Central PMCID: PMC3187250.

57. Ahmed NA, Petersen FC, Scheie AA. AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4258-63. Epub 2009/07/15. doi: 10.1128/AAC.00546-09. PubMed PMID: 19596873; PubMed Central PMCID: PMC2764162.

**Table 1. Primers used for validation of RNA sequencing results with qRT-PCR.**

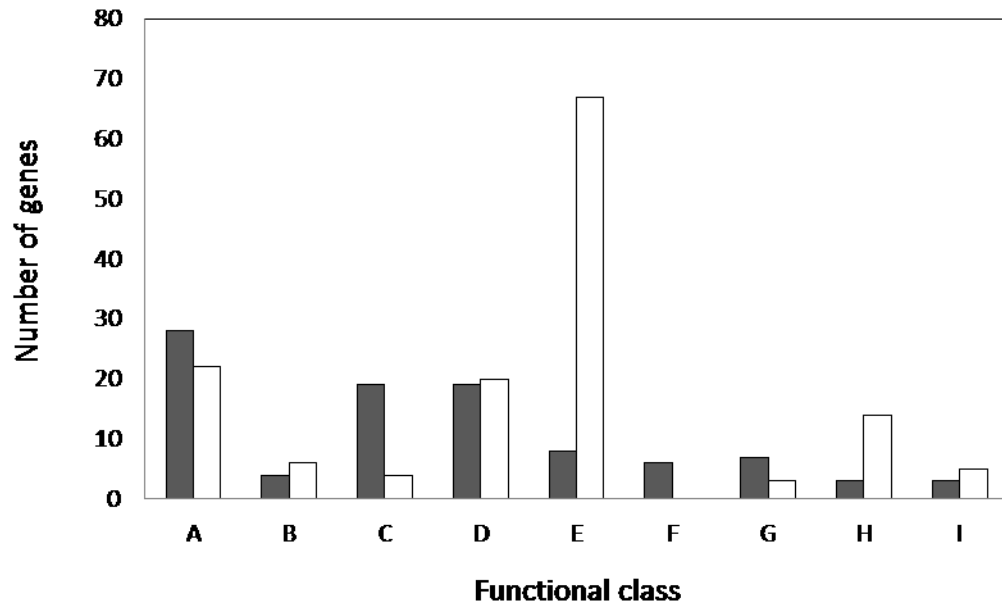
Gene	Sequence (5'-3')	Reference
<i>plc</i>	F: GCTAATGTTACTGCCGTTGA R: CCTCTGATACATCGTGTAAG	Si <i>et al.</i> (2007)
<i>netB</i>	F: AAATATACTTCTAGTGATACCGCTTCACA R: GAGGATCTTCAATAAATGTTCCACTTAA	Cheung <i>et al.</i> (2010)
<i>recA</i>	F :GCTATAGATGTTTTAGTTGTGG R : CTCCATATGAGAACCAAGCTCC	Chalmers <i>et al.</i> (2008)
<i>gyrA</i>	F:ACCACCCACATGGTGATTCAT R:TCATTGCCGCTGCTGAGTCT	
<i>pilC</i>	F: TGTTGGGAAAATAGAGCCAGCA R: TCATGCCCTCAAAGGTAGGT	
<i>appB</i>	F:AGTGATGCCGCTCCTAAAAT R:GCGTTGTAACAGAAGGGTCT	
<i>iolD</i>	F:TTTGTGGTGGTGGAGTTAGA R:CTTACCTGCTTGTGTTTCGC	This study
<i>ribH</i>	F: GACATGGAGTAGAGGAAGAGA R: CTCCGGCATATTTTCCTGATTT	
<i>proA</i>	F : AAGAGGAGGAAGTGAGGCTAT R : TTGAACTGATCCCTCTGGAA	

*luxS*

F: AGCAAGAAGAGATACCAGCA

R: AACCTGTTTTGCATGACTCT

---



**Figure 1. Functional classification of genes differentially expressed in biofilms.**

Black and white bars represent up-regulated and down-regulated genes, respectively. A, unknown, unclassified or hypothetical protein; B, virulence; C, transport; D, metabolism; E, biosynthetic processes; F, transcriptional regulator; G, oxidative stress and SOS response; H, transcription, translation and DNA repair; I, Other.

**Table 2. Genes up-regulated in *C. perfringens* biofilms compared to planktonic cells from a biofilm.**

Feature ID	Product	Fold change
<b>Unknown, unclassified or hypothetical protein</b>		
CP4_3480	Unknown	1,24
CP4_3481	conserved hypothetical protein	1,24
CPF_0255	hypothetical protein	1,8
CPF_0286	hypothetical protein	2,11
CPF_0289	hypothetical protein	1,62
CPF_0439	CBS/transporter associated domain-containing protein	1,51
CPF_0444	BFD-like iron-sulfur cluster-binding protein	1,45
CPF_0552	hypothetical protein	1,47
CPF_0627	hypothetical protein	1,66
CPF_0762	hypothetical protein	2,1
CPF_0870	hypothetical protein	2,79
CPF_0888	response regulator	1,5
CPF_0889	sensor histidine kinase	1,5
CPF_0905	acetyltransferase	2,22
CPF_1344	hypothetical protein	1,75
CPF_1437	hypothetical protein	1,72
CPF_1755	hypothetical protein	1,32
CPF_1874	cation efflux family protein	5,1
CPF_1905	hypothetical protein	1,28
CPF_1926	phosphodiesterase	1,34
CPF_1933	PRC-barrel domain-containing protein	1,24
CPF_1944	hypothetical protein	1,18
CPF_2169	hypothetical protein	1,42
CPF_2263	hypothetical protein	2,33
CPF_2345	sensor histidine kinase	1,61
CPF_2425	hypothetical protein	1,46
CPF_2926	hypothetical protein	1,73
CPF_2928	hypothetical protein	2,07

## Virulence

CPF_1725	hemolysin III	2,47
CPF_1490	tetracycline resistance protein	2
<i>hlyB</i>	hemolysin	1,5
<i>hlyC</i>	hemolysin	2,41

## Transporter

<i>appB</i>	oligopeptide ABC transporter	2,33
<i>appD</i>	oligopeptide ABC transporter	1,91
<i>cax_2</i>	calcium/proton exchanger	2,44
CPF_0159	amino acid permease	4,22
CPF_0537	glycine betaine/L-proline transport, ATP-binding protein	2,49
CPF_0538	glycine betaine/L-proline ABC transporter permease/glycine betaine/L-proline-binding protein	2,06
CPF_1370	sodium:dicarboxylate symporter family protein	4,82
CPF_1422	uracil-xanthine permease	1,56
CPF_1672	sodium:alanine symporter family protein	4,06
CPF_1785	PTS system, sucrose-specific IIBC component	1,69
CPF_2413	ABC transporter substrate-binding protein	1,65
CPF_2552	oligopeptide/dipeptide ABC transporter ATP-binding protein	1,97
CPF_2554	oligopeptide/dipeptide ABC transporter permease	2,45
CPF_2617	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter family protein	1,81
CPF_2650	maltose/maltodextrin ABC transporter permease	2,01
CPF_2651	maltose/maltodextrin ABC transporter permease	2,06
CPF_2652	maltose/maltodextrin ABC transporter maltose/maltodextrin-binding protein	1,72
<i>mgtA</i>	magnesium-translocating P-type ATPase	1,53
<i>uraA</i>	uracil permease	1,55

## Metabolism

<i>araD</i>	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase	2,47
<i>cdsA</i>	phosphatidate cytidylyltransferase	1,6
CPF_0091	propionate CoA-transferase	2,21
CPF_0160	beta-galactosidase	2,54
CPF_1154	7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	1,33
CPF_1389	phosphofructokinase	1,58
CPF_1718	6-phosphofructokinase	2,14
<i>eutP</i>	ethanolamine utilization protein	1,8
<i>eutS</i>	ethanolamine utilization protein	1,83

<i>galT</i>	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	1,83
<i>iolD</i>	myo-inositol catabolism protein	1,55
<i>iolE</i>	myo-inositol catabolism protein	1,42
<i>Mdh</i>	alcohol dehydrogenase	1,83
<i>Pbg</i>	beta-galactosidase	2,46
<i>pduU</i>	propanediol utilization protein	1,81
<i>pduV</i>	propanediol utilization protein	1,78
<i>pfk_1</i>	6-phosphofructokinase	1,56
<i>pfk_2</i>	6-phosphofructokinase	2,1
<i>relA</i>	GTP pyrophosphokinase	1,08

### Biosynthetic processes

<i>ackA</i>	acetate kinase	1,62
<i>acpS</i>	4'-phosphopantetheinyl transferase	1,69
CPF_0037	cytidine/deoxycytidylate deaminase	1,49
CPF_0191	M24/M37 family peptidase	4,79
CPF_2954	acyl-ACP thioesterase	1,74
<i>pgsA</i>	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	1,43
<i>ribA</i>	riboflavin biosynthesis protein	3,21
<i>ribH</i>	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	3,15

### Transcriptional regulator

CP4_3442	transcriptional regulator, MarR family	1,12
CPF_0718	DeoR family transcriptional regulator	1,87
CPF_1887	transcriptional regulatory protein	1,15
<i>fur</i>	FUR family transcriptional regulator	1,85
<i>hrcA</i>	heat-inducible transcription repressor	1,25
<i>lexA</i>	LexA repressor	1,69

### Oxidative stress and SOS response

<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase	1,51
CPF_0077	rubredoxin/rubrerythrin	1,59
CPF_0205	heme oxygenase	1,27
CPF_2866	(2Fe-2S)-binding protein	1,49
CPF_2955	rubredoxin/rubrerythrin	1,29
<i>recA</i>	recombinase A	1,15
<i>vhb</i>	hemoglobin	2,2



## Transcription, translation and DNA metabolism

CPF_0305	MutS domain-containing protein	1,23
<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	1,24
<i>rrfH</i>	5S ribosomal RNA	2,09

### Other

CPF_0871	IS605 family transposase OrfB	2,14
<i>spoIIQ</i>	cell wall-binding protein	4,69
<i>sigG</i>	sporulation sigma factor	1,91

---

**Table 3. Genes down-regulated in *C. perfringens* biofilms compared to planktonic cells from a biofilm.**

Feature ID	Product	Fold change
<b>Unknown, unclassified or hypothetical protein</b>		
CP4_3450	ricin-type beta-trefoil domain protein	-1,19
CPF_0202	hypothetical protein	-1,71
CPF_0344	Unknown	-1,36
CPF_0562	hypothetical protein	-2,14
CPF_0729	hypothetical protein	-2,30
CPF_1441	hypothetical protein	-1,41
CPF_1562	NlpC/P60 family protein	-1,43
CPF_1662	voltage-gated chloride channel family protein	-4,47
CPF_1793	hypothetical protein	-5,44
CPF_1985	DAK2 domain-containing protein	-1,19
CPF_1991	protein kinase	-1,26
CPF_2003	hypothetical protein	-1,40
CPF_2106	S4 domain-containing protein	-1,21
CPF_2132	FMN-dependent dehydrogenase	-2,06
CPF_2208	hypothetical protein	-1,79
CPF_2258	radical SAM domain-containing protein	-1,34
CPF_2559	hypothetical protein	-2,77
CPF_2639	hypothetical protein	-1,49
CPF_2889	DNA-binding protein	-1,23
CPF_2930	hypothetical protein	-1,16
<i>ptp</i>	hypothetical protein	-1,76
<i>rrlG</i>	Unknown	-1,03
<b>Virulence</b>		
<i>cloSI</i>	alpha-clostripain	-2,22
<i>colA</i>	collagenase	-3,59
CP4_3449	necrotic enteritis toxin B	-1,27
CPF_0340	penicillin-binding protein	-1,18
CPF_2932	metallo-beta-lactamase	-1,36
<i>entB</i>	enterotoxin	-1,42

## Transporters

CPF_1191	sodium/dicarboxylate symporter family protein	-2,06
CPF_1756	uracil transporter	-1,42
<i>mgtE</i>	magnesium transporter	-3,36
<i>uraA</i>	uracil transporter	-1,4

## Metabolism

<i>adhE</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	-1,45
<i>buk</i>	butyrate kinase	-1,49
CPF_0293	transketolase, C-terminal subunit	-1,19
CPF_1103	glycosyl hydrolase	-2,13
CPF_1249	2-nitropropane dioxygenase	-2,96
CPF_1421	dipeptidase PepV	-1,25
CPF_2127	phosphoglucomutase/phosphomannomutase	-1,12
CPF_2312	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	-1,25
CPF_2820	M24 family metallopeptidase	-1,43
<i>gmk</i>	guanylate kinase	-1,76
<i>manB</i>	phosphomannomutase	-1,11
<i>pepD_1</i>	aminoacyl-histidine dipeptidase	-1,37
<i>pepD_2</i>	aminoacyl-histidine dipeptidase	-1,22
<i>pfkA</i>	6-phosphofructokinase	-1,24
<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase	-1,39
<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	-1,35
<i>ptb</i>	phosphate butyryltransferase	-1,38
<i>pyk</i>	pyruvate kinase	-1,29
<i>tktC</i>	transketolase	-1,19
<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase	-1,36

## Biosynthetic processes

<i>accA</i>	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	-1,58
<i>accB</i>	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	-1,69
<i>accC</i>	biotin carboxylase	-1,69
<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase subunit beta	-1,78
<i>asd</i>	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-1,42
<i>asnC</i>	asparaginyl-tRNA synthetase	-1,36
<i>atpB</i>	ATP synthase F0F1 subunit beta	-1,38
<i>atpC</i>	ATP synthase F0F1 subunit epsilon	-1,44
<i>atpD</i>	ATP synthase F0F1 subunit beta	-1,39
<i>atpE</i>	ATP synthase F0F1 subunit C	-1,44

<i>atpF</i>	ATP synthase F0F1 subunit B	-1,34
<i>atpH</i>	ATP synthase F0F1 subunit delta	-1,37
<i>atpL</i>	ATP synthase F0F1 subunit C	-1,43
<i>bcd</i>	butyryl-CoA dehydrogenase	-1,2
<i>carA</i>	carbamoyl phosphate synthase small subunit	-1,95
<i>carB</i>	carbamoyl phosphate synthase large subunit	-1,56
<i>cbiG</i>	cobalamin biosynthesis protein	-2,11
<i>cfa</i>	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	-2,11
<i>coaBC</i>	bifunctional phosphopantothoenylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate synthase	-1,65
<i>coaE</i>	dephospho-CoA kinase	-1,27
CPF_0170	cysteine synthase	-2,96
CPF_0243	capsular polysaccharide biosynthesis protein	-1,81
CPF_1888	V-type ATP synthase subunit D	-1,22
CPF_1889	V-type ATP synthase subunit B	-1,17
CPF_1894	V-type ATP synthase subunit K	-1,12
CPF_2165	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	-1,34
CPF_2331	trans-2-enoyl-CoA reductase	-2,23
<i>cysE</i>	serine O-acetyltransferase	-1,65
<i>cysK_1</i>	cysteine synthase	-2,9
<i>cysK_2</i>	cysteine synthase A	-1,53
<i>cysS</i>	cysteinyl-tRNA synthetase	-1,35
<i>dapD</i>	tetrahydrodipicolinate succinylase	-1,33
<i>dnaK</i>	molecular chaperone	-1,1
<i>era</i>	GTP-binding protein	-1,46
<i>fabD</i>	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	-1,77
<i>fabF</i>	3-oxoacyl-ACP synthase	-1,80
<i>fabG</i>	3-ketoacyl-ACP reductase	-1,75
<i>fabH</i>	3-oxoacyl-ACP synthase	-2,66
<i>fabZ</i>	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	-1,86
<i>fnt</i>	methionyl-tRNA formyltransferase	-1,19
<i>guaA</i>	GMP synthase	-1,55
<i>hemL</i>	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	-1,34
<i>ileS</i>	isoleucyl-tRNA synthetase	-1,11
<i>moaA</i>	molybdenum cofactor biosynthesis protein A	-2,17
<i>mtnN</i>	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	-2,60
<i>nadA</i>	quinolinate synthetase	-1,16
<i>nadC</i>	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	-1,21
<i>nadE</i>	NAD synthetase	-1,38
<i>ntpB</i>	V-type ATP synthase subunit B	-1,17
<i>ntpD</i>	V-type ATP synthase subunit D	-1,22
<i>ntpK</i>	V-type ATP synthase subunit K	-1,12
<i>pepP</i>	xaa-pro aminopeptidase	-1,48
<i>pheS</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	-1,92

<i>pheT</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	-1,62
<i>proA</i>	gamma-glutamyl phosphate reductase	-1,68
<i>proS</i>	prolyl-tRNA synthetase	-1,35
<i>prs</i>	phosphoribosylpyrophosphate synthetase	-1,77
<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	-1,41
<i>purB</i>	adenylosuccinate lyase	-1,29
<i>purH</i>	bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	-5,12
<i>purR</i>	pur operon repressor	-1,86
<i>pyrD</i>	dihydroorotate dehydrogenase 1B	-1,37
<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	-1,38
<i>pyrK</i>	dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit	-1,42
<i>speE</i>	spermidine synthase	-2,26
<i>thiH</i>	thiamine biosynthesis protein	-1,50
<i>tuf_1</i>	elongation factor Tu	-1,14

### Oxidative and stress response

CPF_1076	[Fe] hydrogenase	-2,79
<i>hydA</i>	iron hydrogenase	-1,30
<i>nifJ</i>	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	-1,23

### Transcription, translation, DNA metabolism

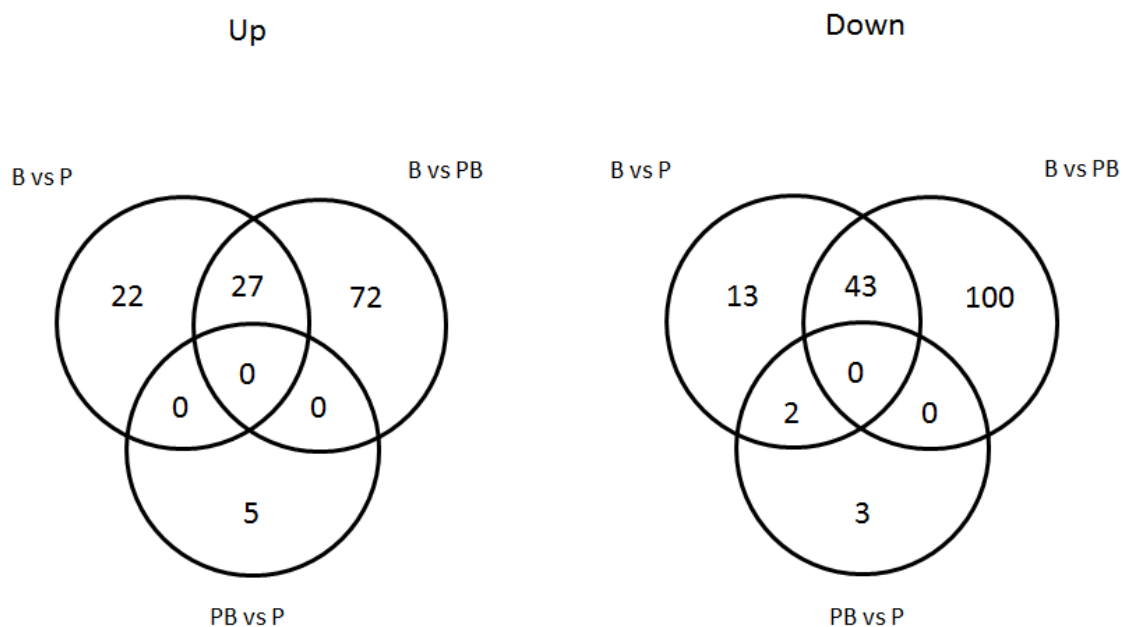
<i>addA</i>	ATP-dependent nuclease subunit A	-1,55
CPF_0426	helicase, UvrD/REP/exonuclease	-2,90
CPF_0580	helicase	-1,35
<i>dnaN</i>	DNA polymerase III subunit beta	-3,77
<i>fusA</i>	elongation factor G	-1,74
<i>pcrA</i>	ATP-dependent DNA helicase	-2,76
<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	-1,28
<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	-1,12
<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	-1,34
<i>rpsD_2</i>	30S ribosomal protein S4	-1,26
<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	-1,18
<i>rrnB</i>	23S ribosomal protein	-1,02
<i>rrnD</i>	16S ribosomal protein	-1,05
<i>ssb</i>	single-strand binding protein	-1,13

### Other

<i>luxS</i>	S-ribosylhomocysteinase	-3,31
-------------	-------------------------	-------

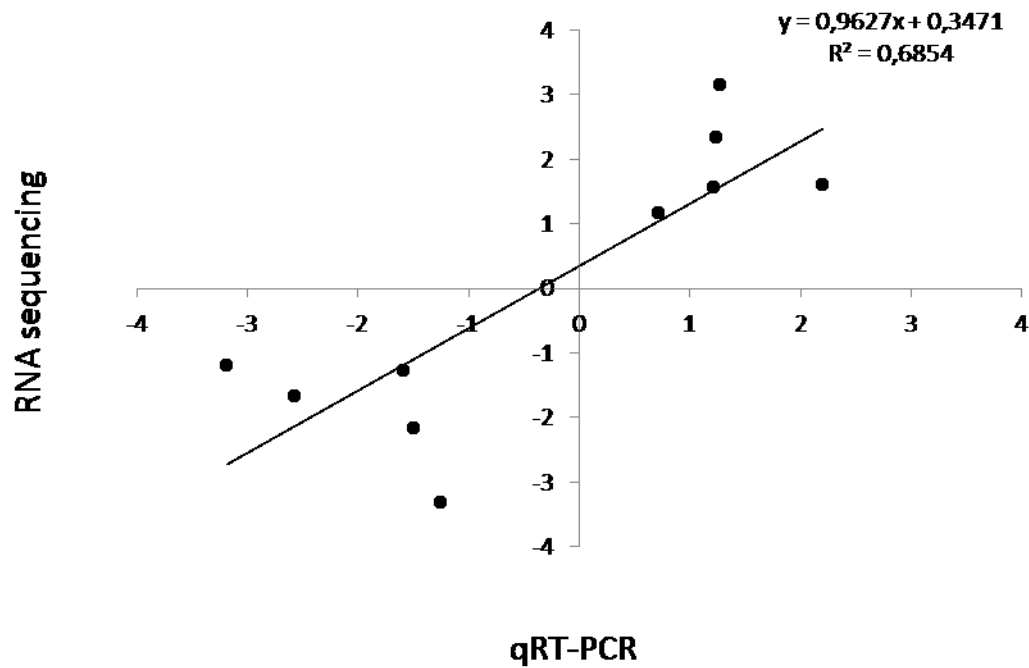
<i>minD</i>	septum site-determining protein	-1,22
<i>mnmA</i>	tRNA-specific 2-thiouridylase	-1,20
<i>rng</i>	ribonuclease, Rne/Rng family	-1,49
<i>yajC</i>	preprotein translocase subunit	-1,98

---



**Figure 2. Gene expression under planktonic, planktonic biofilms and biofilms growth conditions.**

Venn diagrams showing numbers of significantly up- and down-regulated genes shared between each comparison groups: *C. perfringens* biofilms (B), planktonic cells (P) and planktonic cells from the biofilm supernatant (PB). The numbers displayed in circles between the Venn diagrams, referred to as intersections, show the number of genes shared between the two overlapping areas.



**Figure 3. Validation of transcriptomic results of RNA sequencing by qRT-PCR.** Correlation between RNA sequencing and quantitative real-time-PCR gene expression ratios of biofilms and planktonic biofilms. Mean  $\log_2$  ratios obtained during qRT-PCR experiments are plotted against the mean  $\log_2$  ratios obtained with the RNA sequencing.



**Table S1. Genes up-regulated in *C. perfringens* biofilms compared to planktonic cells from a stationary phase culture.**

Feature ID	Product	Fold change
<b>Unknown, unclassified or hypothetical protein</b>		
CP4_3481	conserved hypothetical protein	1.24
<u>CPF_0274</u>	SagA protein	1.17
CPF_0444	BFD-like iron-sulfur cluster-binding protein	1.36
<u>CPF_0719</u>	HAD family hydrolase	1.82
CPF_0762	hypothetical protein	2.26
CPF_0870	hypothetical protein	2.41
CPF_0905	acetyltransferase	2.7
<u>CPF_1216</u>	hypothetical protein	1.73
CPF_1344	hypothetical protein	1.65
CPF_1437	hypothetical protein	1.67
<u>CPF_1926</u>	phosphodiesterase	1.3
<u>CPF_2910</u>	nucleoside recognition domain-containing protein	3.02
CPF_2926	hypothetical protein	1.8
<b>Transporters</b>		
CPF_0537	glycine betaine/L-proline transport, ATP-binding protein	2.53
CPF_1422	uracil-xanthine permease	1.98
<u>CPF_1622</u>	proton-coupled thiamine transporter YuaJ	1.8
CPF_1785	PTS system, sucrose-specific IIBC component	2.27
CPF_2650	maltose/maltodextrin ABC transporter permease	2.58
CPF_2651	maltose/maltodextrin ABC transporter permease	3.92
CPF_2652	maltose/maltodextrin ABC transporter maltose/maltodextrin-binding protein	2.08
<i>mgtA</i>	magnesium-translocating P-type ATPase	1.89
<i>uraA_1</i>	uracil permease	1.58
<b>Metabolism</b>		
<i>alfI</i>	fructose-bisphosphate aldolase	1.53
<u>CP4_3454</u>	chitinase B	1.13
<u>CP4_3455</u>	chitodextrinase	1.12
<u>CPF_0081</u>	fructose-bisphosphate aldolase	1.96
<u>CPF_0643</u>	L-ascorbate 6-phosphate lactonase	3.16
<u>CPF_1782</u>	fructokinase	2.07
<u>CPF_1783</u>	sucrose-6-phosphate dehydrogenase	1.59

<u>CPF_1886</u>	glycoside hydrolase family protein	1.25
<u>glgB</u>	glycogen branching protein	1.43
<u>glmS</u>	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	1.39
<u>iolE</u>	myo-inositol catabolism protein IolE	1.94
<u>sacA</u>	sucrose-6-P hydrolase	1.37

### **Biosynthetic processes**

<u>acpS</u>	4'-phosphopantetheinyl transferase	1.37
CPF_0037	cytidine/deoxycytidylate deaminase	1.59
<u>pbpA</u>	penicillin-binding proteins 1A/1B	1.32
<u>ribA</u>	riboflavin biosynthesis protein RibA	3.38
<u>tagO</u>	undecaprenyl-phosphate N-acetylglucosaminyltransferase	1.16
<u>trpS</u>	tryptophanyl-tRNA synthetase	1.52

### **Transcriptional regulator**

CP4_3442	transcriptional regulator, MarR family	1.18
<u>hrcA</u>	heat-inducible transcription repressor	1.4
<u>lexA</u>	LexA repressor	1.48

### **Oxidative stress and SOS response**

CPF_0077	rubredoxin/rubrerythrin	1.5
CPF_2955	rubredoxin/rubrerythrin	1.25
<u>dnaJ</u>	molecular chaperone DnaJ	1.17
<u>grpE</u>	heat shock protein GrpE	1.21
<u>recA</u>	recombinase A	1.21

### **Other**

CPF_0871	IS605 family transposase OrfB	2.46
----------	-------------------------------	------

---

Underline gene: Gene found only in the biofilm vs planktonic cells from a stationary phase culture comparison group.

**Table S2. Genes down-regulated in *C. perfringens* biofilms compared to planktonic cells from a stationary phase culture.**

Feature ID	Product	Fold change
<b>Unknown, unclassified or hypothetical protein</b>		
CP4_3450	ricin-type beta-trefoil domain protein	-1.21
<u>CP4_3482</u>	conserved hypothetical protein	-1.15
<u>CP4_3483</u>	conserved hypothetical protein	-1.29
CPF_1441	hypothetical protein	-1.36
CPF_1562	NlpC/P60 family protein	-1.53
CPF_2106	S4 domain-containing protein	-1.23
CPF_2132	FMN-dependent dehydrogenase	-2.34
CPF_2930	hypothetical protein	-1.2
<b>Virulence</b>		
CP4_3449	necrotic enteritis toxin B	-1.39
<i>cloSI</i>	alpha-clostripain	-2.81
<i>entB</i>	enterotoxin	-1.34
<b>Metabolism</b>		
<i>buk</i>	butyrate kinase	-1.67
CPF_1249	2-nitropropane dioxygenase	-3.39
CPF_1421	dipeptidase PepV	-1.39
<u><i>hbd</i></u>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	-1.25
<i>nifJ</i>	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	-1.16
<i>pepD_1</i>	aminoacyl-histidine dipeptidase	-1.23
<u><i>pfl</i></u>	formate acetyltransferase	-1.17
<u><i>pflA_1</i></u>	Pyruvate formate-lyase activating enzyme	-1.19
<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase	-1.4
<i>ptb</i>	phosphate butyryltransferase	-1.35
<i>pyk_1</i>	pyruvate kinase	-1.19
<u><i>rpiB</i></u>	ribose-5-phosphate isomerase B	-2.12
<b>Biosynthetic processes</b>		
<i>accB</i>	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	-1.49

<i>accC</i>	biotin carboxylase	-1.41
<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase subunit beta	-1.77
<i>atpF</i>	ATP synthase F0F1 subunit B	-1.23
<i>cfa</i>	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	-2.96
CPF_0170	cysteine synthase	-3.53
CPF_2165	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	-1.48
CPF_2331	trans-2-enoyl-CoA reductase	-2.35
<i>cysE</i>	serine O-acetyltransferase	-1.81
<i>cysK</i>	cysteine synthase	-1.52
<i>dapD</i>	tetrahydrodipicolinate succinylase	-1.32
<i>era</i>	GTP-binding protein Era	-1.53
<i>fabD</i>	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	-1.84
<i>fabF</i>	3-oxoacyl-ACP synthase	-1.81
<i>fabG_1</i>	3-ketoacyl-ACP reductase	-1.76
<i>fabZ</i>	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	-1.54
<i>glyS</i>	glycyl-tRNA synthetase	-1.24
<i>hemL</i>	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	-1.4
<i>nadC</i>	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	-1.14
<i>ntpK</i>	V-type ATP synthase subunit K	-1.1
<i>pepP</i>	xaa-pro aminopeptidase	-1.46
<i>pheS</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	-1.47
<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	-1.46
<i>purD</i>	phosphoribosylamine--glycine ligase	-2.02
<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	-1.27

### Transcription, translation, DNA metabolism

<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	-1.08
<i>rpsD_1</i>	30S ribosomal protein S4	-1.4
<i>rpsD_2</i>	30S ribosomal protein S4	-1.36
<i>rrlB</i>	23S ribosomal RNA	-1.18
<i>rrlH</i>	23S ribosomal RNA	-1.03
<i>nuf_1</i>	elongation factor Tu	-1.26

### Other

<i>hydA</i>	iron hydrogenase	-1.29
<i>luxS</i>	S-ribosylhomocysteinase	-3.93
<i>nifU</i>	nitrogen fixation protein	-1.17
<i>yajC</i>	preprotein translocase subunit YajC	-1.7

Underline gene: Gene found only in the biofilm vs planktonic cells from a stationary phase culture comparison group.

**Table S3. Genes up-regulated in *C. perfringens* planktonic cells from the supernatant of the biofilm compared to planktonic cells.**

Feature ID	Product	Fold change
<b>Unknown, unclassified or hypothetical protein</b>		
<u>CPE2382</u>	hypothetical protein	1.12
<b>Metabolism</b>		
<u>adhE</u>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	1.27
<b>Oxidative stress, SOS response</b>		
<u>dnaK</u>	molecular chaperone DnaK	1.12
<b>Transcription, translation, DNA metabolism</b>		
<u>groES</u>	co-chaperonin GroES	1.13
<u>rplJ</u>	50S ribosomal protein L10	1.05

Underline gene: Gene found only in the planktonic biofilm vs planktonic comparison group.

**Table S4. Genes down-regulated in *C. perfringens* planktonic cells from the supernatant of the biofilm compared to planktonic cells.**

Feature ID	Product	Fold change
<b>Unknown, unclassified or hypothetical protein</b>		
<u>CPE0102</u>	hypothetical protein	-1.36
<u>CPE0165</u>	hypothetical protein	-1.41
<b>Oxidative stress, SOS response</b>		
<u>fer</u>	ferredoxin	-1.52
<b>Transcription, translation, DNA metabolism</b>		
<u>rpsD_1</u>	30S ribosomal protein S4	-1.5
<u>tuf_1</u>	elongation factor Tu	-1.2

Underline gene: Gene found only in the planktonic biofilm vs planktonic comparison group.

## **IV. DISCUSSION GÉNÉRALE**



Le projet de recherche avait comme objectifs d'identifier les éléments génétiques responsables de la résistance à la bacitracine chez *C. perfringens*, d'étudier la formation de biofilm chez *C. perfringens* et de comparer son transcriptome en cultures planctoniques et en biofilm. Afin de réaliser ces objectifs, nous avons construit une banque de souches de *C. perfringens* provenant de poulets, de dindes, de porcs et d'humains, ces dernières provenant du Centre de recherche en infectiologie de l'Université Laval. Divers isolats cliniques provenant du laboratoire de diagnostic moléculaire de la Faculté de médecine vétérinaire ont également été inclus dans la banque de souches.

### Isolement de *C. perfringens*

Dans le cadre de cette étude, deux cent soixante-six isolats de *C. perfringens* ont été récupérés de caeca de dindes, de poulets et de porcs. Le taux d'isolement de *C. perfringens* chez le porc sain était de 88.3%, ce qui est semblable aux taux retrouvés dans d'autres études publiées précédemment [302, 303]. Toutefois, des taux plus faibles ont également été rapportés en Thaïlande et en France [304, 305]. Chez la volaille saine, le taux d'isolement de *C. perfringens* était plus élevé chez la dinde (66 %) que chez le poulet (30 %). Ces résultats sont en accord avec une étude précédente où il a été démontré que l'isolement de *C. perfringens* était plus difficile chez les poulets ayant atteint 22 jours d'âge dû à la modification de leur flore intestinale [21]. Des oiseaux ont pu également être nourris avec une moulée supplémentée avec de la bacitracine en tant qu'additif alimentaire, ce qui a pu contribuer au faible taux d'isolement chez le poulet. En effet, il a déjà été démontré que la bacitracine réduisait les comptes de *C. perfringens* dans les caeca des oiseaux traités [306]. En plus des souches commensales, des souches cliniques ont été ajoutées à cette étude, soit des souches provenant d'humains, de bovins, de moutons, de chèvres, de cerfs, de canards, d'alpagas, de chats, de chevaux ainsi que de lièvres. La majorité des isolats récupérés dans cette étude étaient de type A (273/277), ce qui concorde avec d'autres études publiées [21, 307]. Quelques isolats de type D ont également été trouvés, ceux-ci provenant de bovins ou d'ovins. L'isolement de *C. perfringens* type D chez ces espèces animales a déjà été décrit [308, 309]. Initialement, trois isolats de type E avaient

été trouvés chez la volaille mais suite à des tests de confirmation supplémentaires, ceux-ci se sont révélés être de type A.

### Résistance à la bacitracine

Parmi les 277 isolats de *C. perfringens*, 32 ont démontré une résistance à la bacitracine (dinde,  $n = 19$ ; poulet,  $n = 5$ ; porc,  $n = 8$ ). Parmi ceux-ci, 30 isolats ont démontré de la résistance de haut niveau ( $> 256 \mu\text{g/mL}$ ) alors que 2 isolats possédaient une résistance de faible niveau ( $> 64 \mu\text{g/mL}$ ). Les pourcentages d'isolats de *C. perfringens* résistants à la bacitracine étaient de 17.2 % pour le poulet, de 17.8 % chez la dinde et 16 % chez le porc. La résistance phénotypique à la bacitracine a déjà été décrite dans le passé chez *C. perfringens* mais les gènes impliqués dans cette résistance n'ont pas été déterminés [19, 21]. Afin de vérifier la clonalité des isolats aviaires résistants à la bacitracine, une analyse MLVA (Multiple Loci VNTR Analysis) a été effectuée. Les résultats ont été analysés avec BioNumerics et le dendrogramme obtenu a permis de déterminer que les 24 isolats étaient divisés en 15 types MLVA. Ces derniers sont séparés en trois groupes clonaux, le premier contenant la majorité des isolats ( $n = 16$ ). Ce groupe contenait également tous les isolats de poulet. Parmi les 24 isolats testés, sept paires de souches étaient retrouvées, chaque paire de souches provenant du même animal. De ces paires, seulement deux possédaient plus de 97 % d'homologie en MLVA. Plusieurs études ont démontré qu'il y avait une forte clonalité des isolats provenant d'épisodes d'entérite nécrotique, les oiseaux n'étant colonisés que par un ou deux clones de *C. perfringens* [310-312]. De plus, il a été démontré que chez les oiseaux sains, plusieurs clones pouvaient être retrouvés dans la flore normale [310-312].

Afin d'élucider la base génétique de la résistance à la bacitracine chez *C. perfringens*, la souche c1261\_A résistante de haut niveau (CMI  $> 256 \mu\text{g/mL}$ ) a été sélectionnée. Une approche de marche sur l'ADN a été utilisée en se basant sur la séquence de l'opéron *bcrABD* retrouvé chez *E. faecalis* [176]. Les analyses de séquences des amplicons générés par les amorces *bcr* ont permis de démontrer la présence de quatre cadres de lecture ouverts (ORF) contigus. Deux de ces gènes possédaient de forts pourcentages d'identité de séquence au niveau des acides aminés

avec les gènes *bcrA* et *bcrB* d'*E. faecalis*, suggérant que les gènes identifiés coderaient pour un transporteur ABC. Ceci est supporté par le fait que toutes les souches de *C. perfringens* possédant les gènes *bcrABDR* étaient résistantes de haut niveau à la bacitracine. Dans la littérature, des auteurs suggèrent que le niveau de résistance à la bacitracine dû au transporteur ABC est plus élevé que ceux produits par d'autres mécanismes <sup>[14, 313]</sup>. En effet, Matos *et al.* (2009) ont rapporté récemment que les gènes *bcrA* et *bcrB* d'*E. faecalis* étaient suffisants pour conférer une résistance de haut niveau à la bacitracine <sup>[178]</sup>. De plus, dans notre étude, la souche c1261\_A a été exposée à des inhibiteurs de pompes à efflux afin de vérifier leur influence sur la susceptibilité à la bacitracine. Les pompes à efflux expulsant les antibiotiques de la famille ABC ("ATP-Binding Cassette"), MATE ("Multiple Antimicrobial and Toxin Extrusion"), MFS ("Major Facilitator Superfamily") et SMR ("Small Multi-drug Resistance") sont retrouvées chez les bactéries à Gram positif, les pompes de la famille MFS étant prédominantes <sup>[314]</sup>. Il a été démontré que l'inhibition de ces pompes à efflux permettait de renverser la résistance acquise <sup>[314]</sup>. L'utilisation de certains inhibiteurs de pompes à efflux bactériens a été proposée comme stratégie pour combattre certaines résistances aux antimicrobiens <sup>[314]</sup>. La thioridazine est un inhibiteur général des pompes à efflux bactériennes qui agit en créant des changements ultrastructuraux au niveau des enzymes reliées à la membrane <sup>[315]</sup>. Le verapamil, la réserpine et le prochlorperazine agissent, quant à eux, au niveau des pompes à efflux médiées par la glycoprotéine-P, alors que le probenecid et le MK-571 inhibent l'activité des transporteurs MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) <sup>[314, 316, 317]</sup>. Le probenecid affecte également les transporteurs d'anions organiques <sup>[317]</sup>. Les résultats avec le verapamil, la réserpine, le prochlorperazine ainsi qu'avec le MK-571 n'ont démontré qu'un faible effet inhibiteur, ayant modifié que légèrement les valeurs de CMI pour la bacitracine, alors que le probenecid n'a eu aucune influence sur les valeurs de CMI. Comme la thioridazine est le seul inhibiteur à avoir significativement diminué la susceptibilité de la souche c1261\_A à la bacitracine, une pompe à efflux serait donc impliquée dans la résistance à la bacitracine et ce mécanisme serait indépendant des transporteurs d'anions organiques. De plus, selon ces résultats, les pompes à efflux médiées par la glycoprotéine-P et les transporteurs MRP ne seraient pas les principaux mécanismes impliqués dans la résistance à la bacitracine.

Afin de déterminer si l'expression des gènes *bcr* était activée par la présence de bacitracine, une analyse de PCR en temps réel semi-quantitatif a été effectuée. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que les gènes *bcrABDR* étaient exprimés chez *C. perfringens* lorsque les bactéries étaient en présence de bacitracine. De plus, il a été observé que les gènes *bcrABD* étaient transcrits en un message polycistronique, signifiant que ceux-ci font partie d'un opéron. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Manson *et al.* (2004), qui ont observé qu'un transporteur ABC ainsi qu'une undécaprenol kinase surproduite étaient codés par l'opéron *bcrABD* sous le contrôle du régulateur *bcrR* [176]. Ce dernier a été décrit comme un senseur relié à la membrane ainsi qu'un transducteur du signal permettant de détecter la présence de bacitracine et de réguler l'expression de l'opéron *bcrABDR*.

Comme les gènes *bcr* sont localisés sur un plasmide chez *E. faecalis* [176], des essais de conjugaison entre la souche *C. perfringens* c1261\_A et des isolats de *C. perfringens*, d'*E. coli* et d'*E. faecalis* ont été effectués. Aucun transconjugant n'a été obtenu avec cette technique. Afin de vérifier que les gènes *bcr* étaient situés sur un plasmide, des expériences de curage de plasmides ont été effectuées à l'aide d'acridine orange, de mitomycine C ou suite à des passages à haute température [318]. Ces deux agents chimiques ont été utilisés à des concentrations inhibant la réplication plasmidique mais non la réplication chromosomale. Après 20 passages, la souche *C. perfringens* c1261\_A était toujours résistante à la bacitracine alors qu'elle avait perdu son plasmide contenant les gènes de résistance à la tétracycline *tetA(P)* et *tetB(P)*. Ces résultats suggèrent que chez la souche *C. perfringens* c1261\_A, les gènes *bcr* n'étaient pas situés sur un plasmide. Afin d'élucider la localisation de ces gènes, une analyse de l'ADN total a été effectuée par PFGE. L'enzyme de restriction utilisée, soit I-CeuI, ne coupe que dans les gènes de l'ARNr 23S (gènes *rrn*), présents seulement au niveau du chromosome. Les fragments du chromosome peuvent donc être différenciés des bandes plasmidiques grâce à l'utilisation d'une sonde spécifique pour les gènes *rrn*. Dans cette étude, les sondes *bcrB* et *rrn* ont colocalisés sur un fragment ~ 97 kb, ce qui indique que les gènes *bcr* se retrouvent sur le chromosome. Ceci a également été démontré pour 20 autres isolats de *C. perfringens* résistants à la

bacitracine de notre étude. Ce résultat est en accord avec d'autres articles indiquant que chez tous les autres genres bactériens, à l'exception d'*E. faecalis*, les gènes de résistance à la bacitracine se retrouvent au niveau du chromosome [14, 18, 173, 176]. Curieusement, le transporteur ABC putatif identifié dans cette étude est plus proche génétiquement du transporteur ABC plasmidique retrouvé chez *E. faecalis* [176] que des transporteurs ABC retrouvés chez *B. licheniformis*, *B. subtilis* et *S. mutans* [14, 18, 173]. De plus, le transporteur ABC de *C. perfringens* serait régulé par une seule protéine contenant un domaine XRE ayant une homologie avec le régulateur BcrR d'*E. faecalis* [176]. La famille des régulateurs transcriptionnels XRE contient également des régulateurs impliqués dans la réponse au stress chez les bactéries [319]. Chez toutes les autres pompes à efflux impliquées dans la résistance à la bacitracine décrites à ce jour, la régulation se fait grâce à un système à deux composantes, soit une kinase senseur ainsi que le régulateur. Quelques différences ont été observées entre les opérons *bcrABDR* de *C. perfringens* et d'*E. faecalis*. Les gènes *bcrD*, *bcrB* et *bcrA* de *C. perfringens* sont plus courts que ceux retrouvés chez *E. faecalis* (185 pb, 226 pb, et 234 pb plus courts, respectivement). De plus, la distance entre *bcrA* et *bcrB* est plus grande chez *C. perfringens* (441 pb versus -7 pb chez *E. faecalis*). La présente étude rapporte également pour la première fois la présence d'un gène de transposase de l'IS1216 de chaque côté des gènes de résistance à la bacitracine chez la souche c1261\_A. Ces résultats suggéreraient que l'élément IS1216 proviendrait d'*E. faecalis* et que l'émergence d'un nouvel élément mobile composite IS1216 serait à anticiper.

Afin de mieux caractériser les gènes de résistance aux antibiotiques supplémentaires présents chez les souches résistantes à la bacitracine, des analyses par puce à ADN ont été effectuées. Les résultats de ces analyses ont révélés que les souches analysées possédaient tous les gènes *tetA(P)* et *tetB(P)*, qui codent pour une pompe à efflux et la protection ribosomale, respectivement [320], et qu'une seule souche possédait le gène *erm(B)*, impliqué dans la résistance MLS<sub>B</sub>. Ceci est en accord avec d'autres études qui ont rapportées que les souches de *C. perfringens* isolées de volailles possédaient une susceptibilité réduite à la tétracycline [20, 185]. Toutefois, aucun autre gène de résistance n'a été détecté parmi les souches à l'étude,

indiquant un faible niveau de résistance envers les antibiotiques testés. Ce faible niveau de résistance a également été observé dans d'autres études <sup>[20, 185]</sup>.

### Formation de biofilm

Un autre aspect de la pathogenèse qui peut être impliqué dans la diminution de la susceptibilité des bactéries aux antibiotiques est la formation de biofilm. Avant de débiter l'évaluation de la capacité à former du biofilm des souches de *C. perfringens*, une optimisation des conditions de formation du biofilm a été effectuée. Pour ce faire, plusieurs milieux de culture (Trypticase-Peptide-Glucose, *Fluid thioglycolate*, TSB [*Tryptic soy broth*] supplémenté ou non de 10 mM de glucose ou BHI [*Brain Heart Infusion*] supplémenté ou non de 10 mM de glucose), températures d'incubation (30°C, 35°C ou 44°C) et temps d'incubation (1, 3 ou 6 jours) ont été testés. La formation de biofilm a été détectée dans toutes les conditions testées. Toutefois, une formation de biofilm optimale a été observée lorsque *C. perfringens* était incubé dans du TSB supplémenté en glucose à 44°C pendant 6 jours. Dans la littérature, il a déjà été rapporté que la température de croissance optimale pour *C. perfringens* étaient de 43°C, ce qui appuie les résultats obtenus <sup>[49, 321]</sup>. La majorité des souches testées dans cette étude (230/277) ont démontré une capacité à former du biofilm, et ce, à différents taux. Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés dans les travaux de Varga *et al.* (2008) où toutes les souches testées étaient capables de former du biofilm, avec des densités optiques (DO) variant entre 0.05 et 0.5 <sup>[276]</sup>. Toutefois, Donelli *et al.* (2012) ont obtenu une valeur de densité optique plus élevée pour *C. perfringens*, soit une DO de 3.21 <sup>[275]</sup>. Cette différence pourrait être due au fait que les auteurs ont utilisé un protocole différent pour évaluer la production de biofilm. En effet, les auteurs ont ajouté 20 µL d'une culture à 0.5 MacFarland à 180 µL de BHI supplémenté avec 1 % de glucose puis ils ont incubé les plaques en anaérobie pendant 48h à 37°C. Un autre résultat intéressant de notre étude est que les isolats cliniques provenant du porc formaient significativement plus de biofilm que les souches porcines commensales. Chez *Salmonella* Typhimurium, il a été observé que les isolats cliniques, les isolats associés à des éclosions ainsi que les isolats provenant de produits au détail produisaient des biofilms plus épais que les isolats provenant des abattoirs <sup>[322]</sup>. Dans leur étude, Reisner *et al.* (2006) n'ont pas observé

de formation de biofilm accrue dans le cas d'isolats cliniques humains d'*E. coli* [323]. Toutefois, Skyberg *et al.* (2007) ont observé que les isolats d'*E. coli* isolés d'oiseaux sains produisaient significativement plus de biofilm que les isolats provenant de cas de colibacilloses aviaires [324]. Chez *Listeria monocytogenes*, il a été observé que les isolats provenant des aliments formaient plus de biofilm que les isolats cliniques isolés de cas de listériose [325]. Pour *C. perfringens*, la formation de biofilm pourrait jouer un rôle dans le développement de maladie car le biofilm favorise l'adhésion aux surfaces et facilite la colonisation ainsi que l'infection. De plus, la capacité à former un biofilm favorise la survie des bactéries dans l'environnement [326]. Dans la présente étude, il a été observé que les isolats cliniques de *C. perfringens* produisaient plus de biofilm que les isolats commensaux, ce qui suggérerait que ces isolats cliniques pourraient survivre plus longtemps dans l'environnement.

Afin de mieux caractériser le biofilm produit par *C. perfringens*, une analyse par microscopie confocale a été effectuée et les résultats obtenus étaient en accord avec ceux obtenus par Varga *et al.* (2008) [25]. Dans notre étude, la majorité des biofilms analysés en microscopie confocale étaient plats à l'exception d'un isolat, où une structure en champignon a été observée. Ceci est la première description, à notre connaissance, d'un biofilm en forme de champignon chez *C. perfringens*. Au niveau de la matrice, cette étude a démontré que le biofilm de *C. perfringens* contenait des polysaccharides, des protéines et de l'ADN extracellulaire. La présence de protéines et de polysaccharides a déjà été rapportée dans le biofilm de *C. perfringens* [25]. La présence d'ADN extracellulaire dans la matrice a déjà été observée chez des bactéries à Gram positif [327-329] mais pas chez les *Clostridium* spp. Les mécanismes par lequel l'ADN est relâché dans la matrice du biofilm sont peu connus mais l'autolyse des cellules a été proposée [233, 330]. Chez *E. faecalis*, l'excrétion de l'ADN extracellulaire par autolyse est régulée par l'action des deux protéases GelE et SprE [331] alors que chez *S. aureus*, un système de holine/antiholine a été proposé comme médiateur de la lyse cellulaire et de la mort cellulaire programmée [330, 332]. Dans une étude précédente, aucun ADN extracellulaire n'a été détecté dans le biofilm de la souche de *Bordetella bronchiseptica* 276 ainsi que dans celui de la souche d'*E. coli* EcL 17602 [333], ce qui indique que l'ADN extracellulaire n'entre pas dans la composition de tous les biofilms. Dans cette étude, le PNAG était absent de la matrice du biofilm de *C.*

*perfringens*. Cette absence a également été observée chez d'autres bactéries [333]. La liaison du calcofluor blanc au biofilm de *C. perfringens* indique que des polysaccharides liés en bêta-1,3 ou en bêta-1,4, comme par exemple la cellulose, font partie de la matrice. Afin de confirmer cette hypothèse, les biofilms ont été traités avec de la cellulase [334]. Il a été observé que cette enzyme pouvait disperser le biofilm de *C. perfringens*, ce qui confirme la présence de polysaccharides liés en bêta-1,4 dans la matrice. Comme *C. perfringens* est une bactérie sporulante et que plusieurs études ont démontré qu'il était possible que le biofilm contienne des spores [335-337], la présence de spores de *C. perfringens* a été évaluée au sein de son biofilm. Dans les conditions utilisées dans la présente étude, aucune spore n'a été détectée dans le biofilm.

#### Protection médiée par le biofilm contre les stress environnementaux

*C. perfringens* est une bactérie aérotolérante capable de survivre dans le sol et dans l'eau [2]. Les résultats obtenus suite à l'incubation des biofilms de *C. perfringens* en aérobie ont démontré que le biofilm protégeait les bactéries du stress oxydatif. Varga *et al.* (2008) ont obtenu des résultats similaires dans leur étude [276]. L'implication du biofilm dans la tolérance à l'oxygène a déjà été décrite chez la bactérie anaérobique *Fusobacterium nucleatum* [338]. La présente étude a également démontré que le biofilm pouvait protéger *C. perfringens* contre de fortes concentrations d'antimicrobiens et d'anticoccidiens. Des taux de survie plus élevés chez les cellules de *C. perfringens* en biofilm suite à une exposition à la pénicilline G ont déjà été rapportés [276]. Dans cette étude, il est intéressant de noter que la virginiamycine, la tylosine et les trois anticoccidiens testés possédaient une certaine activité contre les cellules en biofilm, permettant d'avoir des taux de viabilité inférieurs à 50 %. Il a déjà été démontré que la virginiamycine était active contre les biofilms formés par des souches de *Lactobacillus* spp. [339]. Toutefois, l'activité de la tylosine et des anticoccidiens contre les bactéries en biofilm n'avait jamais été décrite. Les résultats n'ont pas pu être sous-divisés entre antimicrobiens bactéricides et bactériostatiques car lorsque les bactériostatiques sont utilisés à de fortes concentrations, ceux-ci deviennent bactéricides [340]. L'inverse a également été rapporté, les agents bactéricides utilisés à de faibles concentrations peuvent devenir



bactériostatiques <sup>[340]</sup>. Dans les essais de tolérance des biofilms, les antimicrobiens ont été utilisés à de fortes concentrations, indiquant que la tylosine et la lincomycine ont probablement agi comme des bactéricides. Dans le cas des essais d'exposition à de faibles doses d'antimicrobiens, tous les antimicrobiens utilisés ont probablement agi comme des bactériostatiques dû aux faibles doses utilisées. De plus, dans cette étude, différentes combinaisons d'antimicrobiens et d'anticoccidiens ont été testées pour leur activité contre les bactéries en biofilm. En général, les taux de viabilité étaient plus faibles lorsque les biofilms étaient exposés aux combinaisons comparativement aux différents composants seuls. Cependant, les différences entre les taux de viabilité n'étaient pas significatives. Différentes combinaisons d'antimicrobiens ont déjà été décrites comme étant actives contre les biofilms de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. faecalis* <sup>[341-344]</sup>. Cette tolérance aux antimicrobiens observée avec les biofilms rend le traitement des infections plus difficile. Pour *C. perfringens*, il a été suggéré que la formation de biofilm par ce microorganisme dans le petit intestin pourrait être impliquée dans la diarrhée associée aux antibiotiques (AAD), une forme d'entérite associée à l'utilisation d'antibiotiques, en facilitant la persistance de la bactérie durant le traitement antibiotique <sup>[276]</sup>. Comme il a été décrit dans la littérature que la présence de concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques pouvait soit augmenter ou diminuer la formation de biofilm <sup>[30, 32, 35]</sup>, l'effet de l'exposition à de faibles concentrations d'antimicrobiens et d'anticoccidiens sur la formation de biofilm par *C. perfringens* a été étudié. Aucune tendance claire n'a été observée sauf dans le cas de la pénicilline, de la lincomycine, de la salinomycine et de la narasine, où la formation de biofilm était plus faible pour la majorité des isolats. Il est intéressant de noter que l'effet des antibiotiques sur la formation de biofilm variait entre les souches testées. Ces variations entre les souches ont également été rapportées chez *S. epidermidis* exposé à 0.5 X la CMI de cefazoline, de vancomycine et de dicloxacilline, ainsi que chez *Streptococcus pyogenes* exposé à des concentrations variant entre 0.015 X et 0.5 X la CMI de fluoroquinolones <sup>[345, 346]</sup>. Afin d'analyser l'effet de faibles doses de bacitracine sur le biofilm de *C. perfringens*, différents biofilms ont été analysés en microscopie confocale. Une augmentation de la région occupée par les bactéries a été observée lorsque les biofilms étaient exposés à de faibles concentrations de bacitracine. Cette augmentation a également été observée dans des biofilms de *S.*

*epidermidis* exposés à 0.25X la CMI d'érythromycine, dans des biofilms de *P. aeruginosa* exposés à 0.25X la CMI d'imipenem et dans des biofilms de *Streptococcus intermedius* exposés à des concentrations sous-inhibitrices d'ampicilline, de ciprofloxacine et de tétracycline <sup>[347-349]</sup>.

L'efficacité de différents désinfectants sur les biofilms de *C. perfringens* a également été analysée dans cette étude. Cinq types de désinfectants utilisés fréquemment dans les fermes et les usines alimentaires ont été testés pour leur capacité à diminuer la viabilité au sein du biofilm. Les résultats obtenus ont démontré que les taux de viabilité étaient plus élevés en biofilm comparativement aux cellules planctoniques lorsque les biofilm étaient traités avec le monopersulfate de potassium, l'ammonium quaternaire, le peroxyde d'hydrogène et le glutéraldéhyde. La tolérance des biofilms face à la désinfection est due à de multiples facteurs dont une diffusion limitée des biocides à travers la matrice <sup>[350]</sup>. En plus de cette limitation physique, l'entrée des désinfectants dans le biofilm peut également être contrôlée par la réaction de celui-ci avec des composants du biofilm comme la matière organique, des particules inorganiques ou des débris cellulaires <sup>[351, 352]</sup>. La matrice extracellulaire posséderait également une charge globale, ce qui fait que des interactions électrostatiques entre la matrice et les biocides empêcheraient ces derniers d'atteindre leurs cibles. Le fait que les bactéries en biofilm possèdent un métabolisme différent des cellules planctoniques pourrait aussi jouer un rôle <sup>[350, 353]</sup>. Dans cette étude, l'hypochlorite de sodium était le désinfectant le plus efficace contre les biofilm de *C. perfringens*. Ce résultat est en accord avec d'autres études où il a été démontré que des solutions de chlore étaient actives contre les bactéries en biofilm <sup>[354-356]</sup>. L'utilisation du chlore a déjà été proposée comme moyen efficace pour dépolymériser et éliminer la matrice qui protège les bactéries de la désinfection <sup>[357]</sup>. Les désinfectants à base de chlore sont les plus utilisés dans les usines alimentaires car ils sont actifs contre une grande variété de bactéries <sup>[354]</sup>. Les biofilms des isolats cliniques semblaient plus tolérants au monopersulfate de potassium ainsi qu'à l'hypochloride de sodium alors que les biofilms des souches commensales semblaient être plus tolérants à l'ammonium quaternaire, au peroxyde d'hydrogène ainsi qu'au glutéraldéhyde. Il a été démontré que le peroxyde d'hydrogène pouvait diffuser et partiellement tuer les cellules seulement dans les biofilms formés par des souches de

*P. aeruginosa* ne produisant pas de catalase <sup>[358]</sup>. Dans le biofilm produit par la souche sauvage, les bactéries étaient protégées de l'action du peroxyde par la destruction du biocide par la catalase. Il a été démontré également que les gènes codant pour des enzymes de protection contre le stress oxydatif étaient sous le contrôle du quorum sensing <sup>[350]</sup>. Il est possible que la susceptibilité réduite des cellules de *C. perfringens* en biofilm soit due à la présence de catalase dans la matrice mais cette hypothèse reste à être prouvée. Dans la présente étude, aucune différence n'a été observée au niveau des taux de viabilité entre les isolats formant peu, modérément ou fortement du biofilm. Il a été démontré que la diffusion limitée des désinfectants au sein du biofilm était due majoritairement aux interactions physicochimiques et non à la barrière physique créée par la matrice <sup>[350]</sup>.

La capacité de *C. perfringens* à former des biofilms mixtes a déjà été décrite <sup>[279]</sup> mais aucune information n'est disponible sur la tolérance de ces biofilms face à la désinfection. Dans la présente étude, des biofilms mixtes contenant *C. perfringens* ATCC 13124 et *S. aureus* E452b3 ou *E.coli* EcL 17606 ainsi que les biofilms simples de ces mêmes bactéries ont été traités avec différents désinfectants. Par la suite, les taux de viabilité au sein des biofilms mixtes ont été comparés à ceux retrouvés au sein des biofilms simples. Il a été observé que le biofilm simple formé par *C. perfringens* était plus résistant à la désinfection que les biofilms mixtes formés en présence de *S. aureus* ou d'*E. coli*. Il a déjà été démontré par Behnke *et al.* (2011) que le biofilm mixte formé par *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* était plus sensible à la désinfection que les biofilms simples de chaque bactérie <sup>[359]</sup>. Ceci pourrait être dû à des interactions antagonistes entre les espèces formant le biofilm grâce à la production de toxines, d'enzymes bactériolytiques, de bactériophage, d'antibiotiques ou de bactériocines <sup>[360]</sup>. Ces diverses interactions pourraient également être impliquées dans le processus de conservation de la niche écologique mais ceci reste à être démontré. Dans la présente étude, les biofilms mixtes ont démontré une résistance accrue à la désinfection comparativement aux biofilms simples de *S. aureus* et d'*E. coli*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres études <sup>[272, 273]</sup>.

## Transcriptome du biofilm

Les biofilms sont définis comme des communautés de cellules microbiennes engouffrées dans une matrice extracellulaire composée de substances polymériques produites par ces mêmes bactéries <sup>[22]</sup>. Présentement, aucune étude n'a été publiée sur le transcriptome du biofilm chez les *Clostridium*. Même s'il est connu que *C. perfringens* peut former du biofilm, les gènes différentiellement exprimés lors de la formation du biofilm n'ont pas été identifiés. Dans cette étude, l'analyse des séquences d'ARN a permis d'identifier 238 gènes significativement différentiellement exprimés entre les cellules en biofilm et les cellules planctoniques retrouvées dans le surnageant du biofilm.

Un des principaux composants de la matrice du biofilm est l'exopolysaccharide (EPS) <sup>[229]</sup>. Quelques EPS sont des homopolysaccharides mais la majorité des EPS sont des hétéropolysaccharides composés d'un mélange de sucres chargés et neutres. Ils peuvent également contenir des molécules organiques ou inorganiques comme le pyruvate, l'acétate, le succinate et, plus rarement, le sulfate <sup>[229, 361]</sup>. Dans cette étude, plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de sucres, de pyruvate et d'acétate sont régulés positivement dans le biofilm. Cette induction des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS lors de la formation de biofilm a déjà été observée dans d'autres études <sup>[37, 362]</sup>. Les EPS sont requis pour l'attachement initial à la surface, pour le développement structurel des biofilms matures et sont considérés comme le composant clé déterminant les propriétés physico-chimiques et biologiques des biofilms <sup>[37]</sup>.

Dans notre étude, la majorité des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras et des acides aminés, la production d'énergie, la traduction, le métabolisme des sucres, la réplication du chromosome ainsi que des gènes impliqués dans la division cellulaire et la sécrétion des protéines étaient régulés négativement lors de la formation du biofilm. Ces résultats suggèreraient qu'au sein du biofilm, les cellules croissent et se répliquent plus lentement. Ceci a également été observé dans d'autres études portant sur le transcriptome du biofilm <sup>[37, 40, 298]</sup>. Ce ralentissement de

la croissance microbienne au sein du biofilm a été attribué à une entrée restreinte des nutriments <sup>[40]</sup>.

Plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress et au stress oxydatif ont été induits dans le biofilm de *C. perfringens*. Cette augmentation de l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif a déjà été rapportée dans le biofilm d'*E. coli* <sup>[363]</sup>. De plus, chez *P. aeruginosa*, une augmentation des niveaux de superoxyde dismutase et d'alkyl hydroperoxide reductase a été rapportée <sup>[364]</sup>. Chez *Neisseria gonorrhoeae*, les mécanismes de tolérance au stress oxydatif semblent être requis pour le maintien d'un biofilm robuste <sup>[365]</sup>. De récentes études ont impliqué le senseur de réponse au stress oxydatif OxyR dans le développement du biofilm chez *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus mutans* et *Candida albicans* <sup>[366]</sup>. Le mécanisme reliant les défenses contre le stress oxydatif et la formation de biofilm est peu connu. Toutefois, il est avancé que l'induction de la formation de biofilm due au stress oxydatif procurerait à la bactérie une stratégie de défense <sup>[366]</sup>. De plus, il a été démontré que les gènes codant pour des toxines (alpha-clostripain, collagénase, NetB, entérotoxine EntB) étaient négativement régulés au sein du biofilm. Ces résultats sont en accord avec d'autres études où il a été démontré que des toxines étaient moins exprimées dans le biofilm <sup>[297, 300]</sup>. Le biofilm étant un mécanisme de survie, la bactérie favoriserait l'expression de gènes essentiels à sa survie, ce qui pourrait expliquer la baisse d'expression des gènes de virulence au sein du biofilm. Toutefois, la présente étude démontre également que les gènes codant pour des hémolysines sont induits dans le biofilm. Caiazza et O'Toole (2003) ont déjà démontré que chez *S. aureus*, l'alpha-hémolysine jouait un rôle dans la formation du biofilm <sup>[367]</sup>. En effet, des mutants ne produisant plus l'alpha-hémolysine n'étaient plus capables de former du biofilm en condition statique ou en flux. Ce phénotype semblerait être dû à une déficience dans les interactions intercellulaires <sup>[367]</sup>. Les hémolysines ont également été impliquées dans la formation de biofilm chez *Streptococcus suis* ainsi que chez les entérocoques <sup>[368, 369]</sup>.

Deux gènes impliqués dans la sporulation ont été induits au sein du biofilm, soit les gènes *sigG* et *spoIIQ*. La protéine SpoIIQ est retrouvée au niveau de la

membrane de la préspore et est impliquée dans l'engouffrement et dans la formation d'un canal entre la cellule mère et la préspore <sup>[370]</sup>. Dans le cas de SigG, cette protéine régule spécifiquement l'expression des gènes au sein de la préspore <sup>[371]</sup>. D'autres études ont démontré l'implication de gènes de sporulation dans la formation de biofilm. En effet, il a été démontré que le régulateur principal de la sporulation chez les bactéries à Gram positif, Spo0A, était requis pour la formation d'un biofilm en pellicule à 25°C <sup>[278]</sup>. Chez *Clostridium difficile* et chez *Bacillus subtilis*, ce même régulateur a été impliqué dans la formation de biofilm à 37°C <sup>[372, 373]</sup>. De plus, lorsqu'il est phosphorylé, le régulateur Spo0A modifie la transcription de plus de 500 gènes chez *B. subtilis* <sup>[374]</sup>. Des études ont également démontré qu'un mutant *sleC* affectait la formation de biofilm chez *C. perfringens* et *C. difficile* <sup>[279, 283]</sup>. La protéine SleC est impliquée dans la germination de la spore, et plus précisément dans la lyse du cortex <sup>[375, 376]</sup>.

Dans cette étude, il a été observé que le gène *luxS* était négativement régulé dans le biofilm. Chez *C. perfringens*, il a été démontré que LuxS induisait la production de toxines <sup>[287]</sup>. La régulation négative du gène *luxS* devrait donc avoir un effet négatif sur la production de toxines. Cet effet a été observé dans cette étude. D'un autre côté, dans plusieurs études, *luxS* est impliqué dans la formation de biofilm <sup>[283, 348, 377, 378]</sup>. Dans cette étude, *luxS* est plus exprimé chez les cellules planctoniques que chez les cellules en biofilm. Chez *C. difficile*, il a été démontré que *luxS* était important pour les premières étapes de la formation de biofilm. En effet, un mutant *luxS* n'a pu adhérer à une surface en verre et former une monocouche de bactéries <sup>[283]</sup>. De plus, chez *S. epidermidis*, il a été démontré que *luxS* réprimait la formation de biofilm via un mécanisme de signalisation intercellulaire basé sur la sécrétion d'autoinducteur 2 <sup>[378]</sup>.

En plus de la comparaison biofilm vs cellules planctoniques retrouvées dans le surnageant du biofilm (SB), des analyses supplémentaires ont été effectuées entre les SB et celles provenant d'une culture planctonique en phase stationnaire (CPS) ainsi qu'entre le biofilm et la CPS. Plusieurs gènes ont été retrouvés uniquement dans le groupe biofilm vs cellules de la CPS. Les gènes régulés positivement étaient impliqués dans le métabolisme, la biosynthèse, le transport et les réponses au stress

alors que les gènes réprimés étaient impliqués dans le métabolisme, la biosynthèse, la traduction et la fixation de l'azote. Au niveau de la comparaison entre les cellules planctoniques du SB et celles provenant d'une culture CPS, seulement 10 gènes différentiellement exprimés ont été observés. De ces gènes, 8 ont été retrouvés uniquement dans ce groupe de comparaison. Les gènes uniques positivement régulés étaient impliqués dans la traduction, le métabolisme et les réponses au stress alors que les gènes réprimés étaient impliqués dans la traduction et les réponses au stress. Dans l'ensemble, ces résultats semblent indiquer que les cellules planctoniques retrouvées dans le surnageant du biofilm ainsi que celles provenant d'une culture stationnaire sont similaires au niveau transcriptionnel puisqu'il n'y a que peu de différence entre les deux populations. D'un autre côté, une plus grande quantité de gènes différentiellement exprimés ont été détectés entre les cellules du biofilm et les cellules du surnageant qu'entre les cellules du biofilm et les cellules planctoniques provenant d'une culture stationnaire. Comme les deux populations planctoniques sont similaires, il est possible que les cellules du surnageant communiquent, par quorum sensing par exemple, avec les cellules du biofilm, affectant la transcription de plusieurs gènes. Toutefois, cette hypothèse reste à être confirmée.

## **V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



Cette étude décrit pour la première fois la caractérisation des gènes *bcrABDR* associés à la résistance acquise à la bacitracine chez la souche aviaire c1261\_A résistante de haut niveau à la bacitracine. Ces gènes, formant un opéron, codent pour une pompe à efflux (*bcrAB*), une undécaprénol kinase (*bcrD*) ainsi qu'un régulateur (*bcrR*) et sont localisés sur le chromosome. En amont et en aval des gènes *bcr*, un élément IS1216-like a été identifié, celui-ci pouvant jouer un rôle dans la dissémination de la résistance à la bacitracine. Des gènes de résistance à la bacitracine ont été également décrits chez *E. faecalis* et ceux-ci possèdent de forts pourcentages d'identité de séquence avec les gènes décrits dans cette étude. Une origine commune de ces gènes de résistance à la bacitracine chez ces deux genres bactériens serait donc possible. Une des prochaines études envisagée au laboratoire sera de type structure-fonction afin de comprendre les fonctions de ces gènes grâce à la construction et à la complémentation de mutants (*bcrR*, *bcrAB*, *bcrRAB*, *bcrD*, *bcrRD*). Les mutants seront créés à l'aide du système de mutagenèse dirigée ClosTron. La CMI des différents mutants envers la bacitracine pourra ensuite être testée afin de déterminer l'importance de chaque gène *bcr* dans la résistance à la bacitracine. La caractérisation ainsi qu'une étude sur la dispersion de l'IS1216-like chez différentes souches de *C. perfringens* permettra de comprendre l'importance de cet élément mobile chez cette espèce ainsi que les gènes de résistance pouvant être intégrés à un élément mobile composite IS1216-like. La caractérisation de l'IS1216-like se fera par séquençage de la souche c1261\_A qui porte cet élément mobile. Grâce aux analyses bio-informatiques, la structure ainsi que les gènes présents dans cet élément mobile composite seront déterminés. À l'aide de la séquence totale de l'IS1216-like obtenue grâce au séquençage, un PCR ciblant cette région pourra être effectué sur diverses souches de *C. perfringens* afin de déterminer la dispersion de l'IS1216-like chez cette espèce.

En ce qui concerne la formation de biofilm, la présente étude a démontré que la majorité des isolats de *C. perfringens* testés ont démontré la capacité à former un biofilm. De plus, les isolats cliniques porcins formaient significativement plus de biofilm que les isolats commensaux. En général, il a été observé que le biofilm de *C. perfringens* pouvait protéger les cellules face à une exposition à de fortes concentrations d'antimicrobiens. Toutefois, il a été démontré que la virginiamycine,

la tylosine ainsi que les anticoccidiens possédaient une certaine activité contre les cellules en biofilm. Une exposition à de faibles doses de pénicilline, de lincomycine, de salinomycine ou de narasine semblait diminuer la quantité de biofilm formé. L'analyse de la matrice du biofilm de *C. perfringens* a démontré que celle-ci contenait des protéines, de l'ADNe ainsi que des polysaccharides liés en bêta-1,4. Ce travail constitue la première description de la présence d'ADNe et de polysaccharides liés en bêta-1,4 dans la matrice du biofilm de *C. perfringens*. Cette étude démontre également que le biofilm de *C. perfringens* protège les cellules bactériennes de la désinfection. De plus, il a été observé que l'hypochlorite de sodium ainsi que le monopersulfate de potassium étaient les désinfectants les plus efficaces contre le biofilm de *C. perfringens*. Dans cette étude, il a également été démontré que les biofilms mixtes de *C. perfringens* formés avec *S. aureus* ou *E. coli* étaient plus tolérants à la désinfection en comparaison aux biofilms simples de *S. aureus* ou d'*E. coli*. Toutefois, le biofilm simple de *C. perfringens* était plus tolérant à la désinfection que les biofilms mixtes formés avec *S. aureus* ou *E. coli*. Afin de poursuivre cette partie sur le biofilm, les exopolysaccharides présents dans la matrice du biofilm formé par *C. perfringens* pourront être identifiés. À cette fin, les exopolysaccharides présents dans la matrice seront extraits puis purifiés pour être ensuite analysés par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse. Ceci permettra de déterminer les sucres ainsi que les différentes liaisons constituant la matrice afin de pouvoir mieux combattre le biofilm. Une autre perspective intéressante serait l'évaluation de la virulence *in vivo* des souches de *C. perfringens* produisant un fort biofilm comparativement à des souches ne produisant qu'un faible biofilm. Ceci permettrait de comprendre l'importance de ce mécanisme dans la virulence. Les isolats provenant des différents groupes de production de biofilm pourraient être inoculés dans un modèle d'infection aviaire (technique des boucles intestinales). Suite à l'infection, une évaluation des lésions en histopathologie serait effectuée sur les différentes boucles d'intestins afin de déterminer le niveau de virulence des différents isolats. Une analyse par microscopie électronique permettrait de vérifier s'il y a présence d'un biofilm au niveau de l'intestin. L'évaluation de la capacité de survie en aérobie de *C. perfringens* à l'intérieur d'un biofilm mixte pourrait également être effectuée. À cette fin, suite à la production de biofilms mixtes en condition aérobie, ceux-ci pourront être récupérés puis étalés sur des géloses sélectives pour *C. perfringens* afin

de vérifier la viabilité suite à une incubation en aérobie. Les biofilms pourront également être colorés à l'aide de l'ensemble "Live/Dead" qui permet de différencier les cellules vivantes (coloration verte) des cellules mortes (coloration rouge). Par la suite, les biofilms colorés seront analysés par microscopie confocale afin de visualiser les ratios de cellules vivantes et de cellules mortes pour chaque microorganisme composant le biofilm mixte. Afin de mieux refléter la situation en abattoirs, l'utilisation de dégraisseurs avant la désinfection des biofilms pourrait également être effectuée. Ceci permettrait de vérifier l'efficacité de ces traitements sur les biofilms de *C. perfringens*.

Cette étude a permis également d'avoir les premières données sur les gènes différentiellement exprimés lors de la formation du biofilm chez *C. perfringens*. Il a été démontré que les gènes négativement exprimés étaient impliqués dans la virulence, dans la production d'énergie, le métabolisme des sucres ainsi que dans la biosynthèse des acides gras et des acides aminés. Dans le cas des gènes positivement régulés, ceux-ci étaient impliqués dans la réponse au stress et au stress oxydatif, dans la biosynthèse des acides gras et des phospholipides ainsi que quelques gènes de virulence. En perspective, la création de différents mutants, à partir des résultats de transcriptomique, permettra de vérifier l'importance de ces gènes dans la formation de biofilm et possiblement dans la virulence. Le gène de quorum sensing *luxS*, les gènes codant pour les hémolysines ainsi que ceux impliqués dans la réponse au stress et au stress oxydatif pourraient être de bons candidats puisque ces gènes sont de façon significative différentiellement exprimés et que ceux-ci ont déjà été impliqués dans la formation de biofilm chez d'autres espèces bactériennes. Les différents mutants seront créés à l'aide du système de mutagenèse dirigée ClosTron. Par la suite, une évaluation de la formation de biofilm de ces mutants pourra être effectuée afin de déterminer l'impact de ces gènes dans la formation de cette structure.

## **VI. SOURCES DOCUMENTAIRES**

1. Petit, L., M. Gibert, and M.R. Popoff, *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. Trends Microbiol, 1999. **7**(3): p. 104-10.
2. Rood, J.I. and S.T. Cole, *Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens*. Microbiol Rev, 1991. **55**(4): p. 621-48.
3. Myers, G.S., et al., *Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, Clostridium perfringens*. Genome Res, 2006. **16**(8): p. 1031-40.
4. Songer, J.G., *Clostridial enteric diseases of domestic animals*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(2): p. 216-34.
5. Lepp, D., et al., *Identification of novel pathogenicity loci in Clostridium perfringens strains that cause avian necrotic enteritis*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10795.
6. Keyburn, A.L., et al., *NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by Clostridium perfringens*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e26.
7. Stone, K.J. and J.L. Strominger, *Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(12): p. 3223-7.
8. Stone, K.J. and J.L. Strominger, *Inhibition of sterol biosynthesis by bacitracin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(5): p. 1287-9.
9. Pavli, V. and V. Kmetec, *Pathways of chemical degradation of polypeptide antibiotic bacitracin*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(11): p. 2160-7.
10. Manson, J.M., J.M. Smith, and G.M. Cook, *Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(10): p. 5764-8.
11. Phillips, I., *Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **30**(2): p. 101-7.
12. Phillips, I., *The use of bacitracin as a growth promoter in animals produces no risk to human health*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44**(6): p. 725-8.
13. Podlesek, Z., et al., *Bacillus licheniformis bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance*. Mol Microbiol, 1995. **16**(5): p. 969-76.

14. Bernard, R., et al., *YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **228**(1): p. 93-7.
15. Lis, M. and H.K. Kuramitsu, *The stress-responsive dgk gene from Streptococcus mutans encodes a putative undecaprenol kinase activity*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1938-43.
16. Fiedler, W. and H. Roterling, *Properties of Escherichia coli mutants lacking membrane-derived oligosaccharides*. J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 14684-9.
17. Pollock, T.J., et al., *Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides*. J Bacteriol, 1994. **176**(20): p. 6229-37.
18. Tsuda, H., et al., *Genes involved in bacitracin resistance in Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(12): p. 3756-64.
19. Watkins, K.L., et al., *In-vitro antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens from commercial turkey and broiler chicken origin*. Vet Microbiol, 1997. **54**(2): p. 195-200.
20. Slavić, D., et al., *Antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario*. Can J Vet Res, 2011. **75**(2): p. 89-97.
21. Chalmers, G., et al., *Genetic diversity of Clostridium perfringens isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm*. Vet Microbiol, 2007.
22. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
23. Jefferson, K.K., *What drives bacteria to produce a biofilm?* FEMS Microbiol Lett, 2004. **236**(2): p. 163-73.
24. Davey, M.E. and A. O'Toole G, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 847-67.
25. Varga, J.J., et al., *Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen Clostridium perfringens and other Clostridia*. Mol Microbiol, 2006. **62**(3): p. 680-94.
26. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(2): p. 114-22.

27. Mah, T.F. and G.A. O'Toole, *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol, 2001. **9**(1): p. 34-9.
28. Pettit, R.K., et al., *Microplate Alamar blue assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 2612-7.
29. Zaidi, A.H., et al., *Cholate-stimulated biofilm formation by Lactococcus lactis cells*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(8): p. 2602-10.
30. Hoffman, L.R., et al., *Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1171-5.
31. Rupp, M.E. and K.E. Hamer, *Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother, 1998. **41**(2): p. 155-61.
32. Majtan, J., et al., *In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium isolated in Slovakia*. J Appl Microbiol, 2008. **104**(5): p. 1294-301.
33. Mirani, Z.A. and N. Jamil, *Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant Staphylococcus aureus*. J Basic Microbiol, 2010. **51**(2): p. 191-5.
34. Pompilio, A., et al., *Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of Stenotrophomonas maltophilia from cystic fibrosis*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 1): p. 76-81.
35. Cerca, N., et al., *Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(12): p. 8677-82.
36. Kolter, R. and R. Losick, *One for all and all for one*. Science, 1998. **280**(5361): p. 226-7.
37. Zhang, W., et al., *Comparative transcriptome analysis of Desulfovibrio vulgaris grown in planktonic culture and mature biofilm on a steel surface*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **76**(2): p. 447-57.

38. Dotsch, A., et al., *The Pseudomonas aeruginosa transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31092.
39. Sauer, K., *The genomics and proteomics of biofilm formation*. Genome Biol, 2003. **4**(6): p. 219.
40. Lo, A.W., et al., *Comparative transcriptomic analysis of Porphyromonas gingivalis biofilm and planktonic cells*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 18.
41. *The Clostridiaceae*, in *The Firmicutes*, P.D. Vos, et al., Editors. 2009. p. 799-801.
42. Allen, S.D., C.L. Emery, and L.D. M., *Clostridium*, in *Manual of clinical microbiology*, P.R. Murray, Editor. 2003, ASM Press. p. 835-856.
43. Songer, J.G. and D.J. Taylor, *Clostridial infections*, in *Diseases of swine*, B.E. Straw, et al., Editors. 2006. p. 613-628.
44. Skerman, V.B.D., V. McGowan, and P.H.A. Sneath, *Approved list of bacterial names*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1980. **30**: p. 225-420.
45. Canard, B., B. Saint-Joanis, and S.T. Cole, *Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe Clostridium perfringens*. Mol Microbiol, 1992. **6**(11): p. 1421-9.
46. O'Brien, D.K. and S.B. Melville, *Multiple effects on Clostridium perfringens binding, uptake and trafficking to lysosomes by inhibitors of macrophage phagocytosis receptors*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 6): p. 1377-86.
47. Kalelkar, S., et al., *Structure of the capsular polysaccharide of Clostridium perfringens Hobbs 5 as determined by NMR spectroscopy*. Carbohydr Res, 1997. **299**(3): p. 119-28.
48. O'Brien, D.K. and S.B. Melville, *The anaerobic pathogen Clostridium perfringens can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions*. Cell Microbiol, 2000. **2**(6): p. 505-19.
49. Li, J. and B.A. McClane, *Further comparison of temperature effects on growth and survival of Clostridium perfringens type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(7): p. 4561-8.



50. Alam, S.I., et al., *Differential proteomic analysis of Clostridium perfringens ATCC13124; identification of dominant, surface and structure associated proteins*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 162.
51. Nowell, V.J., et al., *Clostridium perfringens in retail chicken*. Anaerobe, 2009.
52. Songer, J.G., *Clostridia as agents of zoonotic disease*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 399-404.
53. Urbina, P., et al., *Effects of bilayer composition and physical properties on the phospholipase C and sphingomyelinase activities of Clostridium perfringens alpha-toxin*. Biochim Biophys Acta, 2011.
54. Naylor, C.E., et al., *Structure of the key toxin in gas gangrene*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(8): p. 738-46.
55. Oda, M., et al., *Clostridium perfringens alpha-toxin recognizes the GM1a-TrkA complex*. J Biol Chem, 2012. **287**(39): p. 33070-9.
56. Monturiol-Gross, L., et al., *Reactive oxygen species and the MEK/ERK pathway are involved in the toxicity of clostridium perfringens alpha-toxin, a prototype bacterial phospholipase C*. J Infect Dis, 2012. **206**(8): p. 1218-26.
57. Kennedy, C.L., et al., *Cross-complementation of Clostridium perfringens PLC and Clostridium septicum alpha-toxin mutants reveals PLC is sufficient to mediate gas gangrene*. Microbes Infect, 2009. **11**(3): p. 413-8.
58. Sakurai, J. and C.L. Duncan, *Some properties of beta-toxin produced by Clostridium perfringens type C*. Infect Immun, 1978. **21**(2): p. 678-80.
59. Autheman, D., et al., *Clostridium perfringens beta-toxin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64644.
60. Nagahama, M., et al., *Biological activities and pore formation of Clostridium perfringens beta toxin in HL 60 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36934-41.
61. Shatursky, O., et al., *Clostridium perfringens beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5546-51.

62. Hunter, S.E., et al., *Molecular genetic analysis of beta-toxin of Clostridium perfringens reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 1993. **61**(9): p. 3958-65.
63. Katayama, S., et al., *Genome mapping of Clostridium perfringens strains with I-CeuI shows many virulence genes to be plasmid-borne*. Mol Gen Genet, 1996. **251**(6): p. 720-6.
64. Sayeed, S., J. Li, and B.A. McClane, *Characterization of virulence plasmid diversity among Clostridium perfringens type B isolates*. Infect Immun, 2010. **78**(1): p. 495-504.
65. Sayeed, S., et al., *Beta toxin is essential for the intestinal virulence of Clostridium perfringens type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model*. Mol Microbiol, 2008. **67**(1): p. 15-30.
66. Vidal, J.E., et al., *Effects of Clostridium perfringens beta-toxin on the rabbit small intestine and colon*. Infect Immun, 2008. **76**(10): p. 4396-404.
67. Nagahama, M., et al., *Involvement of tachykinin receptors in Clostridium perfringens beta-toxin-induced plasma extravasation*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(1): p. 23-30.
68. Schumacher, V.L., et al., *Endothelial binding of beta toxin to small intestinal mucosal endothelial cells in early stages of experimentally induced Clostridium perfringens type C enteritis in pigs*. Vet Pathol, 2013. **50**(4): p. 626-9.
69. Songer, J.G. and R.R. Meer, *Genotyping of Clostridium perfringens by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals*. Anaerobe, 1996. **2**: p. 197-203.
70. Sakurai, J., M. Nagahama, and Y. Fujii, *Effect of Clostridium perfringens epsilon toxin on the cardiovascular system of rats*. Infect Immun, 1983. **42**(3): p. 1183-6.
71. Miyamoto, O., et al., *Clostridium perfringens epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **189**(1): p. 109-13.
72. Caudle, W.M. and J. Zhang, *Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease*. Exp Neurol, 2009. **220**(2): p. 230-3.

73. Hunter, S.E., et al., *Cloning and nucleotide sequencing of the Clostridium perfringens epsilon-toxin gene and its expression in Escherichia coli*. Infect Immun, 1992. **60**(1): p. 102-10.
74. Minami, J., et al., *Lambda-toxin of Clostridium perfringens activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides*. Microbiol Immunol, 1997. **41**(7): p. 527-35.
75. Shimizu, T., et al., *Genomic map of Clostridium perfringens strain 13*. Microbiol Immunol, 2001. **45**(2): p. 179-89.
76. Miyata, S., et al., *Clostridium perfringens epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39463-8.
77. Fennessey, C.M., et al., *Oligomerization of Clostridium perfringens epsilon toxin is dependent upon caveolins 1 and 2*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46866.
78. Knapp, O., et al., *Identification of the channel-forming domain of Clostridium perfringens Epsilon-toxin (ETX)*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(12): p. 2584-93.
79. Perelle, S., et al., *Characterization of Clostridium perfringens iota-toxin genes and expression in Escherichia coli*. Infect Immun, 1993. **61**(12): p. 5147-56.
80. Li, J., K. Miyamoto, and B.A. McClane, *Comparison of virulence plasmids among Clostridium perfringens type E isolates*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1811-9.
81. Nagahama, M., et al., *Binding and internalization of Clostridium perfringens iota-toxin in lipid rafts*. Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3267-75.
82. Considine, R.V. and L.L. Simpson, *Cellular and molecular actions of binary toxins possessing ADP-ribosyltransferase activity*. Toxicon, 1991. **29**(8): p. 913-36.
83. Haug, G., K. Aktories, and H. Barth, *The host cell chaperone Hsp90 is necessary for cytotoxic action of the binary iota-like toxins*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 3066-8.
84. Gibert, M., et al., *Differential requirement for the translocation of clostridial binary toxins: iota toxin requires a membrane potential gradient*. FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1287-96.

85. Perelle, S., M. Domenighini, and M.R. Popoff, *Evidence that Arg-295, Glu-378, and Glu-380 are active-site residues of the ADP-ribosyltransferase activity of iota toxin*. FEBS Lett, 1996. **395**(2-3): p. 191-4.
86. Aktories, K., *Clostridial ADP-ribosylating toxins: effects on ATP and GTP-binding proteins*. Mol Cell Biochem, 1994. **138**(1-2): p. 167-76.
87. Hilger, H., et al., *The long-lived nature of clostridium perfringens iota toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis*. Infect Immun, 2009. **77**(12): p. 5593-601.
88. Nagahama, M., et al., *Clostridium perfringens iota-toxin b induces rapid cell necrosis*. Infect Immun, 2011. **79**(11): p. 4353-60.
89. Kimura, J., et al., *Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction*. J Biol Chem, 2009. **285**(1): p. 401-8.
90. Harry, K.H., et al., *Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation-specific sigma factors SigE and SigK in Clostridium perfringens*. J Bacteriol, 2009. **191**(8): p. 2728-42.
91. Hanna, P.C., et al., *Localization of the receptor-binding region of Clostridium perfringens enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11037-43.
92. Katahira, J., et al., *Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin*. J Cell Biol, 1997. **136**(6): p. 1239-47.
93. Katahira, J., et al., *Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26652-8.
94. Shrestha, A. and B.A. McClane, *Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of Clostridium perfringens enterotoxin*. MBio, 2013. **4**(1).
95. Veshnyakova, A., et al., *On the Interaction of Clostridium perfringens Enterotoxin with Claudins*. Toxins (Basel), 2010. **2**(6): p. 1336-56.
96. Robertson, S.L. and B.A. McClane, *Interactions between Clostridium perfringens enterotoxin and claudins*. Methods Mol Biol, 2011. **762**: p. 63-75.

97. Kokai-Kun, J.F., et al., *Identification of a Clostridium perfringens enterotoxin region required for large complex formation and cytotoxicity by random mutagenesis*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5634-41.
98. Chen, J., et al., *Cysteine-scanning mutagenesis supports the importance of Clostridium perfringens enterotoxin amino acids 80 to 106 for membrane insertion and pore formation*. Infect Immun, 2012. **80**(12): p. 4078-88.
99. Sonoda, N., et al., *Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier*. J Cell Biol, 1999. **147**(1): p. 195-204.
100. Gibert, M., C. Jolivet-Reynaud, and M.R. Popoff, *Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens*. Gene, 1997. **203**(1): p. 65-73.
101. Bacciarini, L.N., et al., *Immunohistochemical localization of Clostridium perfringens beta2-toxin in the gastrointestinal tract of horses*. Vet Pathol, 2003. **40**(4): p. 376-81.
102. Amimoto, K., et al., *A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of Clostridium perfringens type C*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 4): p. 1198-206.
103. Manich, M., et al., *Clostridium perfringens delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming toxins, but shows functional differences*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3764.
104. Hatheway, C.L., *Toxigenic clostridia*. Clin Microbiol Rev, 1990. **3**(1): p. 66-98.
105. Rood, J.I., *Virulence genes of Clostridium perfringens*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 333-60.
106. Gurjar, A., J. Li, and B.A. McClane, *Characterization of toxin plasmids in Clostridium perfringens type C isolates*. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4860-9.
107. Li, J., et al., *Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of Clostridium perfringens type D strain CN3718*. PLoS Pathog, 2011. **7**(12): p. e1002429.

108. Chitayat, S., et al., *The solution structure of the C-terminal modular pair from Clostridium perfringens mu-toxin reveals a noncellulosomal dockerin module.* J Mol Biol, 2008. **381**(5): p. 1202-12.
109. Nelson, L.D., S. Chiantia, and E. London, *Perfringolysin O association with ordered lipid domains: implications for transmembrane protein raft affinity.* Biophys J, 2010. **99**(10): p. 3255-63.
110. Chen, J., J.I. Rood, and B.A. McClane, *Epsilon-toxin production by Clostridium perfringens type D strain CN3718 is dependent upon the agr operon but not the VirS/VirR two-component regulatory system.* MBio, 2011. **2**(6).
111. Li, J., et al., *CodY is a global regulator of virulence-associated properties for Clostridium perfringens type D strain CN3718.* MBio, 2013. **4**(5): p. e00770-13.
112. Nagahama, M., et al., *Clostridium perfringens TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins.* Infect Immun, 2011. **79**(2): p. 905-10.
113. Carter, G.P., et al., *Expression of the large clostridial toxins is controlled by conserved regulatory mechanisms.* Int J Med Microbiol, 2014.
114. Schorch, B., et al., *LRPI is a receptor for Clostridium perfringens TpeL toxin indicating a two-receptor model of clostridial glycosylating toxins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(17): p. 6431-6.
115. Davies, D.G., A.M. Chakrabarty, and G.G. Geesey, *Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa.* Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(4): p. 1181-6.
116. Guttenberg, G., et al., *Molecular characteristics of Clostridium perfringens TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells.* J Biol Chem, 2012. **287**(30): p. 24929-40.
117. Paredes-Sabja, D., N. Sarker, and M.R. Sarker, *Clostridium perfringens tpeL is expressed during sporulation.* Microb Pathog, 2011. **51**(5): p. 384-8.
118. Martin, T.G. and J.A. Smyth, *Prevalence of netB among some clinical isolates of Clostridium perfringens from animals in the United States.* Vet Microbiol, 2009. **136**(1-2): p. 202-5.

119. Yan, X.X., et al., *Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from Clostridium perfringens*. MBio, 2013. **4**(1): p. e00019-13.
120. Fernandes da Costa, S.P., et al., *Identification of a key residue for oligomerisation and pore-formation of Clostridium perfringens NetB*. Toxins (Basel), 2014. **6**(3): p. 1049-61.
121. Alouf, J.E. and C. Jolivet-Reynaud, *Purification and characterization of Clostridium perfringens delta-toxin*. Infect Immun, 1981. **31**(2): p. 536-46.
122. Cavaillon, J.M., et al., *Ganglioside identification on human monocyte membrane with Clostridium perfringens delta-toxin*. J Leukoc Biol, 1986. **40**(1): p. 65-72.
123. Jolivet-Reynaud, C., J.M. Cavaillon, and J.E. Alouf, *Selective cytotoxicity of Clostridium perfringens delta toxin on rabbit leukocytes*. Infect Immun, 1982. **38**(3): p. 860-4.
124. Jolivet-Reynaud, C. and J.E. Alouf, *Binding of Clostridium perfringens 125I-labeled delta-toxin to erythrocytes*. J Biol Chem, 1983. **258**(3): p. 1871-7.
125. Huyet, J., et al., *Structural Insights into Clostridium perfringens Delta Toxin Pore Formation*. PloS One, 2013. **8**(6).
126. Matsushita, O., et al., *Purification and characterization of Clostridium perfringens 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene*. J Bacteriol, 1994. **176**(1): p. 149-56.
127. Yoshihara, K., et al., *Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from Clostridium histolyticum encoding a collagenase and a gelatinase*. J Bacteriol, 1994. **176**(21): p. 6489-96.
128. Awad, M.M., et al., *Construction and virulence testing of a collagenase mutant of Clostridium perfringens*. Microb Pathog, 2000. **28**(2): p. 107-17.
129. Jin, F., et al., *Purification, characterization, and primary structure of Clostridium perfringens lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 230-7.
130. Harkness, J.M., J. Li, and B.A. McClane, *Identification of a lambda toxin-negative Clostridium perfringens strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly*. Anaerobe, 2012. **18**(5): p. 546-52.

131. Canard, B., et al., *Molecular genetic analysis of the nagH gene encoding a hyaluronidase of Clostridium perfringens*. Mol Gen Genet, 1994. **243**(2): p. 215-24.
132. Shimizu, T., et al., *Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 996-1001.
133. Boraston, A.B., E. Ficko-Blean, and M. Healey, *Carbohydrate recognition by a large sialidase toxin from Clostridium perfringens*. Biochemistry, 2007. **46**(40): p. 11352-60.
134. Hiscox, T.J., et al., *Regulation of sialidase production in Clostridium perfringens by the orphan sensor histidine kinase ReeS*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73525.
135. Chiarezza, M., et al., *The NanI and NanJ sialidases of Clostridium perfringens are not essential for virulence*. Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4421-8.
136. Li, J. and B. McClane, *Contributions of NanI Sialidase to Caco-2 Cell Adherence by Clostridium perfringens Type A and C Human Intestinal Disease Strains*. Infect Immun, 2014.
137. Dupuy, B., et al., *Clostridium perfringens urease genes are plasmid borne*. Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2313-20.
138. Mobley, H.L. and R.P. Hausinger, *Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization*. Microbiol Rev, 1989. **53**(1): p. 85-108.
139. Yoo, H.S., et al., *Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(1): p. 228-32.
140. Hakkarainen, T.W., et al., *Necrotizing soft tissue infections: review and current concepts in treatment, systems of care, and outcomes*. Curr Probl Surg, 2014. **51**(8): p. 344-62.
141. Stevens, D.L., *The pathogenesis of clostridial myonecrosis*. Int J Med Microbiol, 2000. **290**(4-5): p. 497-502.
142. Hart, G.B. and M.B. Strauss, *Gas gangrene-clostridial myonecrosis: A review*. Journal of hyperbaric medicine, 1990. **5**(2): p. 125-144.



143. Stephens, M.B., *Gas gangrene: potential for hyperbaric oxygen therapy*. Postgrad Med, 1996. **99**(4): p. 217-20, 224.
144. Korhonen, K., *Hyperbaric oxygen therapy in acute necrotizing infections. With a special reference to the effects on tissue gas tensions*. Ann Chir Gynaecol, 2000. **89 Suppl 214**: p. 7-36.
145. Muhvich, K.H., L.H. Anderson, and W.J. Mehm, *Evaluation of antimicrobials combined with hyperbaric oxygen in a mouse model of clostridial myonecrosis*. J Trauma, 1994. **36**(1): p. 7-10.
146. Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the United States*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(5): p. 607-25.
147. Paredes-Sabja, D. and M.R. Sarker, *Clostridium perfringens sporulation and its relevance to pathogenesis*. Future Microbiol, 2009. **4**(5): p. 519-25.
148. Paredes-Sabja, D. and M.R. Sarker, *Germination response of spores of the pathogenic bacterium Clostridium perfringens and Clostridium difficile to cultured human epithelial cells*. Anaerobe, 2011. **17**(2): p. 78-84.
149. Gui, L., et al., *Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult*. Mod Pathol, 2002. **15**(1): p. 66-70.
150. Murrell, T.G. and P.D. Walker, *The pigbel story of Papua New Guinea*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991. **85**(1): p. 119-22.
151. Cooper, K.K. and J.G. Songer, *Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by Clostridium perfringens type A*. Anaerobe, 2009. **15**(1-2): p. 55-60.
152. Van Immerseel, F., et al., *Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health*. Avian Pathol, 2004. **33**(6): p. 537-49.
153. Shane, S.M., et al., *Etiology and pathogenesis of necrotic enteritis*. Vet Res Commun, 1985. **9**(4): p. 269-87.
154. Helmboldt, C.F. and E.S. Bryant, *The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl*. Avian Dis, 1971. **15**(4): p. 775-80.
155. Al-Sheikhly, F. and A. Al-Saieg, *Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens*. Avian Dis, 1980. **24**(2): p. 324-33.

156. Drew, M.D., et al., *Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of Clostridium perfringens in broiler chickens*. Poult Sci, 2004. **83**(3): p. 414-20.
157. Branton, S.L., et al., *The effect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in broiler chickens*. Poult Sci, 1997. **76**(1): p. 24-8.
158. Yu, H., Y.L. Chan, and I.G. Wool, *The identification of the determinants of the cyclic, sequential binding of elongation factors tu and g to the ribosome*. J Mol Biol, 2009. **386**(3): p. 802-13.
159. Ficken, M.D. and D. Wages, *Necrotic enteritis*, in *Diseases of poultry*, Y.M. Saif, et al., Editors. 1997, Iowa State University Press: London. p. 261-264.
160. Butaye, P., L.A. Devriese, and F. Haesebrouck, *Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(2): p. 175-88.
161. Meszaros, J. and L. Pesti, *Studies on the pathogenesis of gastroenteritis in swine. Preliminary report*. Acta Vet Acad Sci Hung, 1965. **15**(4): p. 465-70.
162. Hogh, P., *Necrotizing infectious enteritis in piglets, caused by Clostridium perfringens type C. II. Incidence and clinical features*. Acta Vet Scand, 1967. **8**(4): p. 301-23.
163. Kennedy, K.K., et al., *Vaccination of pregnant sows with Clostridium perfringens type C toxoid*. Vet Med Small Anim Clin, 1977. **72**(6): p. 1047-9.
164. Songer, J.G. and F.A. Uzal, *Clostridial enteric infections in pigs*. J Vet Diagn Invest, 2005. **17**: p. 528-536.
165. Bueschel, D.M., et al., *Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in Clostridium perfringens field isolates: correlation of genotype with phenotype*. Vet Microbiol, 2003. **94**(2): p. 121-9.
166. Rasmussen, B.A., K. Bush, and F.P. Tally, *Antimicrobial resistance in anaerobes*. Clin Infect Dis, 1997. **24 Suppl 1**: p. S110-20.
167. Bryan, L.E., S.K. Kowand, and H.M. Van Den Elzen, *Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: Clostridium perfringens and Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother, 1979. **15**(1): p. 7-13.

168. Perreten, V., et al., *Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2291-302.
169. Cerda, P., et al., *Detection of the aminoglycosidestreptothricin resistance gene cluster ant(6)-sat4-aph(3')-III in commensal viridans group streptococci*. Int Microbiol, 2007. **10**(1): p. 57-60.
170. Jana, S. and J.K. Deb, *Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **70**(2): p. 140-50.
171. Derbise, A., S. Aubert, and N. El Solh, *Mapping the regions carrying the three contiguous antibiotic resistance genes aadE, sat4, and aphA-3 in the genomes of staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(5): p. 1024-32.
172. Then, R.L. and P. Angehrn, *Low trimethoprim susceptibility of anaerobic bacteria due to insensitive dihydrofolate reductases*. Antimicrob Agents Chemother, 1979. **15**(1): p. 1-6.
173. Neumuller, A.M., D. Konz, and M.A. Marahiel, *The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of Bacillus licheniformis ATCC 10716*. Eur J Biochem, 2001. **268**(11): p. 3180-9.
174. Mascher, T., et al., *Cell wall stress responses in Bacillus subtilis: the regulatory network of the bacitracin stimulon*. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1591-604.
175. Casewell, M., et al., *The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(2): p. 159-61.
176. Manson, J.M., et al., *Acquired bacitracin resistance in Enterococcus faecalis is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(10): p. 3743-8.
177. Harel, Y.M., A. Bailone, and E. Bibi, *Resistance to bacitracin as modulated by an Escherichia coli homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from Bacillus licheniformis*. J Bacteriol, 1999. **181**(19): p. 6176-8.
178. Matos, R., et al., *Study on the dissemination of the bcrABDR cluster in Enterococcus spp. reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer*

- high-level bacitracin resistance*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **34**(2): p. 142-7.
179. Cain, B.D., et al., *Amplification of the bacA gene confers bacitracin resistance to Escherichia coli*. J Bacteriol, 1993. **175**(12): p. 3784-9.
180. Chalker, A.F., et al., *The bacA gene, which determines bacitracin susceptibility in Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus, is also required for virulence*. Microbiology, 2000. **146 ( Pt 7)**: p. 1547-53.
181. El Ghachi, M., et al., *The bacA gene of Escherichia coli encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30106-13.
182. Cao, M. and J.D. Helmann, *Regulation of the Bacillus subtilis bcrC bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors*. J Bacteriol, 2002. **184**(22): p. 6123-9.
183. Chalmers, G., et al., *Genetic diversity of Clostridium perfringens isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm*. Vet Microbiol, 2008. **127**(1-2): p. 116-27.
184. Gholamiandehkordi, A., et al., *Antimicrobial resistance in Clostridium perfringens isolates from broilers in Belgium*. Vet Res Commun, 2009.
185. Johansson, A., et al., *Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of Clostridium perfringens from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes*. Vet Microbiol, 2004. **99**(3-4): p. 251-7.
186. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 232-60 ; second page, table of contents.
187. Kather, E.J., S.L. Marks, and J.E. Foley, *Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine Clostridium perfringens isolates*. Vet Microbiol, 2006. **113**(1-2): p. 97-101.
188. Sasaki, Y., et al., *Tetracycline-resistance genes of Clostridium perfringens, Clostridium septicum and Clostridium sordellii isolated from cattle affected with malignant edema*. Vet Microbiol, 2001. **83**(1): p. 61-9.

189. Vester, B. and S. Douthwaite, *Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(1): p. 1-12.
190. Prescott, J.F., *Lincosamides, Macrolides and Pleuromutilins*, in *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, J.F. Prescott, J.D. Baggot, and R.D. Walker, Editors. 2000, Iowa State University Press: Ames.
191. Berryman, D.I., M. Lyrstis, and J.I. Rood, *Cloning and sequence analysis of ermQ, the predominant macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene in Clostridium perfringens*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(5): p. 1041-6.
192. Soge, O.O., et al., *A conjugative macrolide resistance gene, mef(A), in environmental Clostridium perfringens carrying multiple macrolide and/or tetracycline resistance genes*. J Appl Microbiol, 2009. **106**(1): p. 34-40.
193. Perea-Mejia, L.M., et al., *Erythromycin resistance associated to mefA gene and emm75 allele in Streptococcus pyogenes from uncomplicated pharyngitis in Mexico*. International Congress Series, 2006. **1289**: p. 99-102.
194. Brisson-Noël, A., et al., *Inactivation of lincosaminide antibiotics in Staphylococcus. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes*. J Biol Chem, 1988. **263**: p. 15880-15887.
195. Bozdogan, B., et al., *A new resistance gene, linB, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in Enterococcus faecium HM1025*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(4): p. 925-9.
196. Effiong, G.S., et al., *Amelioration of chloramphenicol induced toxicity in rats by coconut water*. . Journal of applied sciences research, 2010. **6**(4): p. 331-335.
197. Tittlemier, S.A., et al., *Analysis of veterinary drug residues in fish and shrimp composites collected during the Canadian Total Diet Study, 1993-2004*. Food Addit Contam, 2007. **24**(1): p. 14-20.
198. Martel, A., et al., *Susceptibility of Clostridium perfringens strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials*. Avian Pathol, 2004. **33**(1): p. 3-7.

199. Bannam, T.L. and J.I. Rood, *Relationship between the Clostridium perfringens catQ gene product and chloramphenicol acetyltransferases from other bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(3): p. 471-6.
200. Kouassi, K.A., et al., *Clostridium perfringens and Clostridium difficile in cooked beef sold in Cote d'Ivoire and their antimicrobial susceptibility*. Anaerobe, 2014. **28**: p. 90-4.
201. Marchand-Austin, A., et al., *Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic bacteria in Ontario, 2010-2011*. Anaerobe, 2014. **28**: p. 120-5.
202. Lawhon, S.D., A. Taylor, and V.R. Fajt, *Frequency of resistance in obligate anaerobic bacteria isolated from dogs, cats, and horses to antimicrobial agents*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(11): p. 3804-10.
203. Catalan, A., et al., *Tetracycline and penicillin resistant Clostridium perfringens isolated from the fangs and venom glands of Loxosceles laeta: its implications in loxoscelism treatment*. Toxicon, 2010. **56**(6): p. 890-6.
204. Lopez, D., H. Vlamakis, and R. Kolter, *Biofilms*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. a000398.
205. Costerton, J.W., G.G. Geesey, and K.J. Cheng, *How bacteria stick*. Sci Am, 1978. **238**(1): p. 86-95.
206. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 711-45.
207. Solano, C., M. Echeverz, and I. Lasa, *Biofilm dispersion and quorum sensing*. Curr Opin Microbiol, 2014. **18**: p. 96-104.
208. Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley, *Evolving concepts in biofilm infections*. Cell Microbiol, 2009. **11**(7): p. 1034-43.
209. Karatan, E. and P. Watnick, *Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(2): p. 310-47.
210. Kirov, S.M., M. Castrisios, and J.G. Shaw, *Aeromonas flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 1939-45.

211. Lemon, K.P., D.E. Higgins, and R. Kolter, *Flagellar motility is critical for Listeria monocytogenes biofilm formation*. J Bacteriol, 2007. **189**(12): p. 4418-24.
212. McClaine, J.W. and R.M. Ford, *Characterizing the adhesion of motile and nonmotile Escherichia coli to a glass surface using a parallel-plate flow chamber*. Biotechnol Bioeng, 2002. **78**(2): p. 179-89.
213. Toutain, C.M., et al., *Roles for flagellar stators in biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa*. Res Microbiol, 2007. **158**(5): p. 471-7.
214. Bechet, M. and R. Blondeau, *Factors associated with the adherence and biofilm formation by Aeromonas caviae on glass surfaces*. J Appl Microbiol, 2003. **94**(6): p. 1072-8.
215. Bodenmiller, D., E. Toh, and Y.V. Brun, *Development of surface adhesion in Caulobacter crescentus*. J Bacteriol, 2004. **186**(5): p. 1438-47.
216. Kang, Y., et al., *Ralstonia solanacearum requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence*. Mol Microbiol, 2002. **46**(2): p. 427-37.
217. Merz, A.J., M. So, and M.P. Sheetz, *Pilus retraction powers bacterial twitching motility*. Nature, 2000. **407**(6800): p. 98-102.
218. Van Dellen, K.L., L. Houot, and P.I. Watnick, *Genetic analysis of Vibrio cholerae monolayer formation reveals a key role for DeltaPsi in the transition to permanent attachment*. J Bacteriol, 2008. **190**(24): p. 8185-96.
219. Newell, P.D., R.D. Monds, and G.A. O'Toole, *LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by Pseudomonas fluorescens Pf0-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3461-6.
220. Hinsa, S.M., et al., *Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by Pseudomonas fluorescens WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein*. Mol Microbiol, 2003. **49**(4): p. 905-18.
221. Caiazza, N.C. and G.A. O'Toole, *SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14*. J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4476-85.

222. Agladze, K., X. Wang, and T. Romeo, *Spatial periodicity of Escherichia coli K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA*. J Bacteriol, 2005. **187**(24): p. 8237-46.
223. Davies, D.G. and G.G. Geesey, *Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(3): p. 860-7.
224. Jacques, M., V. Aragon, and Y.D. Tremblay, *Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance*. Anim Health Res Rev, 2010. **11**(2): p. 97-121.
225. Boyd, A. and A.M. Chakrabarty, *Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(7): p. 2355-9.
226. Puskas, A., et al., *A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol, 1997. **179**(23): p. 7530-7.
227. Sauer, K., et al., *Characterization of nutrient-induced dispersion in Pseudomonas aeruginosa PAOI biofilm*. J Bacteriol, 2004. **186**(21): p. 7312-26.
228. Gjermansen, M., et al., *Characterization of starvation-induced dispersion in Pseudomonas putida biofilms*. Environ Microbiol, 2005. **7**(6): p. 894-906.
229. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(9): p. 623-33.
230. Gotz, F., *Staphylococcus and biofilms*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1367-78.
231. Ryder, C., M. Byrd, and D.J. Wozniak, *Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(6): p. 644-8.
232. Danese, P.N., L.A. Pratt, and R. Kolter, *Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture*. J Bacteriol, 2000. **182**(12): p. 3593-6.
233. Ma, L., et al., *Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000354.



234. Sutherland, I.W., *The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment*. Trends Microbiol, 2001. **9**(5): p. 222-7.
235. Frolund, B., et al., *Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin*. Water Res, 1996. **30**: p. 1749-1758.
236. Skillman, L., I.W. Sutherland, and M.V. Jonse, *The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development*. J Appl Microbiol, 1999. **85**: p. S13-S18.
237. Zhang, X. and P.L. Bishop, *Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances*. Chemosphere, 2003. **50**(1): p. 63-9.
238. Kaplan, J.B., et al., *Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in Actinobacillus actinomycetemcomitans and Actinobacillus pleuropneumoniae biofilms*. J Bacteriol, 2004. **186**(24): p. 8213-20.
239. Diggle, S.P., et al., *The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol, 2006. **8**(6): p. 1095-104.
240. Tielker, D., et al., *Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 5): p. 1313-23.
241. Johansson, E.M., et al., *Inhibition and dispersion of Pseudomonas aeruginosa biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB*. Chem Biol, 2008. **15**(12): p. 1249-57.
242. Fong, J.C., et al., *Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in Vibrio cholerae*. J Bacteriol, 2006. **188**(3): p. 1049-59.
243. Lasa, I. and J.R. Penades, *Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation*. Res Microbiol, 2006. **157**(2): p. 99-107.
244. Cucarella, C., et al., *Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2177-85.
245. Tormo, M.A., et al., *Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer?* Microbiology, 2005. **151**(Pt 7): p. 2465-75.

246. Otzen, D. and P.H. Nielsen, *We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(6): p. 910-27.
247. Sherlock, O., et al., *Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic Escherichia coli: cell aggregation and biofilm formation*. J Bacteriol, 2004. **186**(23): p. 8058-65.
248. Sherlock, O., R.M. Vejborg, and P. Klemm, *The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic Escherichia coli is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1954-63.
249. Danese, P.N., et al., *The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within Escherichia coli biofilms*. Mol Microbiol, 2000. **37**(2): p. 424-32.
250. Zogaj, X., et al., *The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix*. Mol Microbiol, 2001. **39**(6): p. 1452-63.
251. Beloin, C., et al., *Global impact of mature biofilm lifestyle on Escherichia coli K-12 gene expression*. Mol Microbiol, 2004. **51**(3): p. 659-74.
252. Domka, J., et al., *Temporal gene-expression in Escherichia coli K-12 biofilms*. Environ Microbiol, 2007. **9**(2): p. 332-46.
253. Izano, E.A., et al., *Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(2): p. 470-6.
254. van Schaik, E.J., et al., *DNA binding: a novel function of Pseudomonas aeruginosa type IV pili*. J Bacteriol, 2005. **187**(4): p. 1455-64.
255. Yang, L., et al., *Effects of iron on DNA release and biofilm development by Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 5): p. 1318-28.
256. Allesen-Holm, M., et al., *A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms*. Mol Microbiol, 2006. **59**(4): p. 1114-28.
257. Whitchurch, C.B., et al., *Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation*. Science, 2002. **295**(5559): p. 1487.

258. Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza, *Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000213.
259. Bockelmann, U., et al., *Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **262**(1): p. 31-8.
260. Steinberger, R.E. and P.A. Holden, *Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(9): p. 5404-10.
261. Davey, M.E., N.C. Caiazza, and G.A. O'Toole, *Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. J Bacteriol, 2003. **185**(3): p. 1027-36.
262. Sand, W. and T. Gehrke, *Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria*. Res Microbiol, 2006. **157**(1): p. 49-56.
263. Ron, E.Z. and E. Rosenberg, *Natural roles of biosurfactants*. Environ Microbiol, 2001. **3**(4): p. 229-36.
264. Luppens, S.B., et al., *Development of a standard test to assess the resistance of Staphylococcus aureus biofilm cells to disinfectants*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(9): p. 4194-200.
265. Stewart, P.S., *Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms*. Int J Med Microbiol, 2002. **292**(2): p. 107-13.
266. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 167-93.
267. Gilbert, P., et al., *The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities*. Adv Microb Physiol, 2002. **46**: p. 202-56.
268. Top, E.M., D. Springael, and N. Boon, *Erratum to "Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters"*. FEMS Microbiol Ecol, 2003. **44**(1): p. 137.
269. Hannan, S., et al., *Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(3): p. 345-9.

270. Kelly, B.G., A. Vespermann, and D.J. Bolton, *Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens*. Food Chem Toxicol, 2009. **47**(5): p. 969-77.
271. Habimana, O., et al., *Enhanced surface colonization by Escherichia coli O157:H7 in biofilms formed by an Acinetobacter calcoaceticus isolate from meat-processing environments*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(13): p. 4557-9.
272. Luppens, S.B., et al., *Effect of Veillonella parvula on the antimicrobial resistance and gene expression of Streptococcus mutans grown in a dual-species biofilm*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(3): p. 183-9.
273. Simoes, M., L.C. Simoes, and M.J. Vieira, *Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments*. Water Res, 2009. **43**(1): p. 229-37.
274. Odenholt, I., *Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations*. Int J Antimicrob Agents, 2001. **17**(1): p. 1-8.
275. Donelli, G., et al., *Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **65**(2): p. 318-25.
276. Varga, J.J., B. Therit, and S.B. Melville, *Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen Clostridium perfringens*. Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 4944-51.
277. Ledder, R.G., et al., *Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria*. FEMS Microbiol Ecol, 2008. **66**(3): p. 630-6.
278. Obana, N., K. Nakamura, and N. Nomura, *A sporulation factor is involved in the morphological change of Clostridium perfringens biofilms in response to temperature*. J Bacteriol, 2014. **196**(8): p. 1540-50.
279. Pantaleon, V., et al., *Biofilms of Clostridium species*. Anaerobe, 2014.
280. Leung, J.W., et al., *Early attachment of anaerobic bacteria may play an important role in biliary stent blockage*. Gastrointest Endosc, 2000. **52**(6): p. 725-9.
281. Woods, J., et al., *Development and application of a polymicrobial, in vitro, wound biofilm model*. J Appl Microbiol, 2012. **112**(5): p. 998-1006.

282. Macfarlane, S., E.J. Woodmansey, and G.T. Macfarlane, *Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(11): p. 7483-92.
283. Ethapa, T., et al., *Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen Clostridium difficile*. J Bacteriol, 2013. **195**(3): p. 545-55.
284. Carter, G.P., et al., *Quorum sensing in Clostridium difficile: analysis of a luxS-type signalling system*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 2): p. 119-27.
285. Lee, A.S. and K.P. Song, *LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in Clostridium difficile*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(3): p. 659-66.
286. Chen, J. and B.A. McClane, *Role of the Agr-like quorum-sensing system in regulating toxin production by Clostridium perfringens type B strains CN1793 and CN1795*. Infect Immun, 2012. **80**(9): p. 3008-17.
287. Ohtani, K., H. Hayashi, and T. Shimizu, *The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in Clostridium perfringens*. Mol Microbiol, 2002. **44**(1): p. 171-9.
288. Nagalakshmi, U., K. Waern, and M. Snyder, *RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis*. Curr Protoc Mol Biol, 2010. **Chapter 4**: p. Unit 4 11 1-13.
289. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 57-63.
290. Tseng, E. and J.G. Underwood, *Full Length cDNA Sequencing on the PacBio® RS*. Journal of biomolecular techniques, 2013. **24** (suppl).
291. Lin, Y.F., et al., *A combination of improved differential and global RNA-seq reveals pervasive transcription initiation and events in all stages of the life-cycle of functional RNAs in Propionibacterium acnes, a major contributor to wide-spread human disease*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 620.
292. Schena, M., et al., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science, 1995. **270**(5235): p. 467-70.

293. Klopffleisch, R. and A.D. Gruber, *Transcriptome and proteome research in veterinary science: what is possible and what questions can be asked?* ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 254962.
294. Duggan, D.J., et al., *Expression profiling using cDNA microarrays*. Nat Genet, 1999. **21**(1 Suppl): p. 10-4.
295. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
296. Poitras, E. and A. Houde, *La PCR en temps réel: principes et applications*. Reviews in Biology and Biotechnology, 2002. **2**.
297. Resch, A., et al., *Differential gene expression profiling of Staphylococcus aureus cultivated under biofilm and planktonic conditions*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2663-76.
298. Yao, Y., D.E. Sturdevant, and M. Otto, *Genomewide analysis of gene expression in Staphylococcus epidermidis biofilms: insights into the pathophysiology of S. epidermidis biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms*. J Infect Dis, 2005. **191**(2): p. 289-98.
299. Yadav, M.K., et al., *Gene expression profile of early in vitro biofilms of Streptococcus pneumoniae*. Microbiol Immunol, 2012. **56**(9): p. 621-9.
300. Sanchez, C.J., et al., *Streptococcus pneumoniae in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28738.
301. Shemesh, M., A. Tam, and D. Steinberg, *Differential gene expression profiling of Streptococcus mutans cultured under biofilm and planktonic conditions*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 5): p. 1307-17.
302. Baker, A.A., et al., *Prevalence and diversity of toxigenic Clostridium perfringens and Clostridium difficile among swine herds in the midwest*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(9): p. 2961-7.
303. Kukier, E., et al., *Occurrence and expression of toxin genes in Clostridium perfringens isolates from pigs*. Bull Vet Inst Pulawy, 2012. **56**: p. 495-498.

304. Tansuphasiri, U., W. Matra, and L. Sangsuk, *Antimicrobial resistance among Clostridium perfringens isolated from various sources in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2005. **36**(4): p. 954-61.
305. Fosse, J., et al., *On-farm multi-contamination of pigs by food-borne bacterial zoonotic hazards: an exploratory study*. Vet Microbiol, 2011. **147**(1-2): p. 209-13.
306. Engberg, R.M., et al., *Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers*. Poult Sci, 2000. **79**(9): p. 1311-9.
307. Songer, J.G., *Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals*. Clinical Microbiology Reviews, 1996. **9**(2): p. 216-234.
308. Ferrarezi, M.C., T.C. Cardoso, and I.S. Dutra, *Genotyping of Clostridium perfringens isolated from calves with neonatal diarrhea*. Anaerobe, 2008. **14**(6): p. 328-31.
309. Sipos, W., et al., *Genotyping of Clostridium perfringens isolated from domestic and exotic ruminants and swine*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2003. **50**(7): p. 360-2.
310. Chalmers, G., et al., *Multilocus sequence typing analysis of Clostridium perfringens isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(12): p. 3957-64.
311. Engstrom, B.E., et al., *Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry*. Vet Microbiol, 2003. **94**(3): p. 225-35.
312. Gholamiandekhordi, A.R., et al., *Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status*. Vet Microbiol, 2006. **113**(1-2): p. 143-52.
313. Bernard, R., et al., *BcrC from Bacillus subtilis acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 28852-7.
314. Kaatz, G.W., *Inhibition of bacterial efflux pumps: a new strategy to combat increasing antimicrobial agent resistance*. Expert Opin Emerg Drugs, 2002. **7**(2): p. 223-33.
315. Thanacoody, H.K., *Thioridazine: resurrection as an antimicrobial agent?* Br J Clin Pharmacol, 2007. **64**(5): p. 566-74.

316. Dahan, A. and G.L. Amidon, *Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: the role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs*. Mol Pharm, 2009. **6**(1): p. 19-28.
317. Lismond, A., et al., *Cooperation between prokaryotic (Lde) and eukaryotic (MRP) efflux transporters in J774 macrophages infected with Listeria monocytogenes: studies with ciprofloxacin and moxifloxacin*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(9): p. 3040-6.
318. Kulkarni, R.S. and P.P. Kanekar, *Effects of some curing agents on phenotypic stability in Pseudomonas putida degrading e-caprolactam*. World J Microbiol and Biotech, 1998. **14**: p. 255-257.
319. Liu, Y., et al., *Transcriptome dynamics of Deinococcus radiodurans recovering from ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4191-6.
320. Sloan, J., et al., *The Clostridium perfringens Tet P determinant comprises two overlapping genes: tetA(P), which mediates active tetracycline efflux, and tetB(P), which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants*. Mol Microbiol, 1994. **11**(2): p. 403-15.
321. Garcia-Alvarado, J.S., M.A. Rodriguez, and R.G. Labbe, *Influence of elevated temperature on starch hydrolysis by enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of Clostridium perfringens type A*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(1): p. 326-30.
322. Castelijin, G.A., et al., *Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of Salmonella Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium*. Biofouling, 2012. **28**(1): p. 51-63.
323. Reisner, A., et al., *In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic Escherichia coli strains: impact of environmental and genetic factors*. J Bacteriol, 2006. **188**(10): p. 3572-81.
324. Skyberg, J.A., et al., *Biofilm formation by avian Escherichia coli in relation to media, source and phylogeny*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(2): p. 548-54.
325. Barbosa, J., et al., *Biofilm Formation among Clinical and Food Isolates of Listeria monocytogenes*. Int J Microbiol, 2013. **2013**: p. 524975.



326. Semenyuk, E.G., et al., *Spore formation and toxin production in Clostridium difficile biofilms*. PLoS One, 2014. **9**(1).
327. Domenech, M., et al., *Insight into the composition of the intercellular matrix of Streptococcus pneumoniae biofilms*. Environ Microbiol, 2012.
328. Kaplan, J.B., et al., *Low Levels of beta-Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in Staphylococcus aureus*. MBio, 2012. **3**(4).
329. Barnes, A.M., et al., *Enterococcus faecalis Produces Abundant Extracellular Structures Containing DNA in the Absence of Cell Lysis during Early Biofilm Formation*. MBio, 2012. **3**(4).
330. Bayles, K.W., *The biological role of death and lysis in biofilm development*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(9): p. 721-6.
331. Thomas, V.C., et al., *Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by Enterococcus faecalis extracellular proteases influences biofilm development*. J Bacteriol, 2008. **190**(16): p. 5690-8.
332. Rice, K.C. and K.W. Bayles, *Molecular control of bacterial death and lysis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(1): p. 85-109, table of contents.
333. Wu, C., et al., *Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria*. J Appl Microbiol, 2013. **115**(1): p. 30-40.
334. Jain, A. and N.B. Bhosle, *Role of beta 1-4 linked polymers in the biofilm structure of marine Pseudomonas sp. CE-2 on 304 stainless steel coupons*. Biofouling, 2008. **24**(4): p. 283-90.
335. Faille, C., et al., *Sporulation of Bacillus spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments*. Food Microbiol, 2014. **40**: p. 64-74.
336. Semenyuk, E.G., et al., *Spore formation and toxin production in Clostridium difficile biofilms*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87757.
337. Nam, H., et al., *Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating Bacillus cereus spores attached to and in a biofilm on stainless steel*. Int J Food Microbiol, 2014. **188**: p. 122-7.

338. Gursoy, U.K., et al., *Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of Fusobacterium nucleatum in an oral mucosa culture model*. J Periodontol, 2010. **81**(7): p. 1084-91.
339. Rich, J.O., et al., *Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms*. Bioresour Technol, 2011. **102**(2): p. 1124-30.
340. Pankey, G.A. and L.D. Sabath, *Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(6): p. 864-70.
341. Saginur, R., et al., *Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 55-61.
342. Wu, W.S., et al., *Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Microbiol Immunol Infect, 2013. **46**(2): p. 89-95.
343. Tre-Hardy, M., et al., *In vitro activity of antibiotic combinations against Pseudomonas aeruginosa biofilm and planktonic cultures*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **31**(4): p. 329-36.
344. Holmberg, A., M. Morgelin, and M. Rasmussen, *Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against Enterococcus faecalis in biofilms*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(2): p. 433-9.
345. Henriques, M., et al., *Influence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobial agents on biofilm formation in indwelling medical devices*. Int J Artif Organs, 2005. **28**(11): p. 1181-5.
346. Balaji, K., R. Thenmozhi, and S.K. Pandian, *Effect of subinhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of Streptococcus pyogenes*. Indian J Med Res, 2013. **137**(5): p. 963-71.
347. Bagge, N., et al., *Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(4): p. 1175-87.

348. Ahmed, N.A., F.C. Petersen, and A.A. Scheie, *AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by Streptococcus intermedius in the presence of antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(10): p. 4258-63.
349. Wang, Q., et al., *Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(6): p. 2707-11.
350. Bridier, A., et al., *Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review*. Biofouling, 2011. **27**(9): p. 1017-32.
351. Pereira, M.O., et al., *Comparison of two biocides--carbamate and glutaraldehyde--in the control of fouling in pulp and paper industry*. Environ Technol, 2001. **22**(7): p. 781-90.
352. Grobe, K.J., J. Zahller, and P.S. Stewart, *Role of dose concentration in biocide efficacy against Pseudomonas aeruginosa biofilms*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002. **29**(1): p. 10-5.
353. Vilain, S., et al., *Biofilm proteome: homogeneity or versatility?* J Proteome Res, 2004. **3**(1): p. 132-6.
354. Wang, R., et al., *Biofilm formation by Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment*. J Food Prot, 2012. **75**(8): p. 1418-28.
355. Davison, W.M., B. Pitts, and P.S. Stewart, *Spatial and temporal patterns of biocide action against Staphylococcus epidermidis biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(7): p. 2920-7.
356. Saravanan, P., et al., *Biofilm formation by Pseudoalteromonas ruthenica and its removal by chlorine*. Biofouling, 2006. **22**(5-6): p. 371-81.
357. Lomander, A., et al., *Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces*. Bioresour Technol, 2004. **94**(3): p. 275-83.
358. Stewart, P.S., et al., *Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(2): p. 836-8.

359. Behnke, S., et al., *Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(20): p. 7176-84.
360. Tait, K. and I.W. Sutherland, *Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms*. J Appl Microbiol, 2002. **93**(2): p. 345-52.
361. Esperanza Troyano, et al., *Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by Zoogloea ramigera 115SLR*. Carbohydrate Polymers, 1996. **31**(1-2): p. 35-40.
362. Huse, H.K., et al., *Pseudomonas aeruginosa enhances production of a non-alginate exopolysaccharide during long-term colonization of the cystic fibrosis lung*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82621.
363. Schembri, M.A., K. Kjaergaard, and P. Klemm, *Global gene expression in Escherichia coli biofilms*. Mol Microbiol, 2003. **48**(1): p. 253-67.
364. Sauer, K., et al., *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. J Bacteriol, 2002. **184**(4): p. 1140-54.
365. Falsetta, M.L., et al., *The Composition and Metabolic Phenotype of Neisseria gonorrhoeae Biofilms*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 75.
366. Honma, K., et al., *The OxyR homologue in Tannerella forsythia regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 6): p. 1912-22.
367. Caiazza, N.C. and G.A. O'Toole, *Alpha-toxin is required for biofilm formation by Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2003. **185**(10): p. 3214-7.
368. Wang, Y., et al., *Comparative proteomic analysis of Streptococcus suis biofilms and planktonic cells that identified biofilm infection-related immunogenic proteins*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e33371.
369. Tsikrikonis, G., et al., *Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin*. Microb Pathog, 2012. **52**(6): p. 336-43.
370. Saujet, L., et al., *Genome-wide analysis of cell type-specific gene transcription during spore formation in Clostridium difficile*. PLoS Genet, 2013. **9**(10): p. e1003756.

371. Li, J. and B.A. McClane, *Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in Clostridium perfringens sporulation and enterotoxin synthesis*. Infect Immun, 2010. **78**(10): p. 4286-93.
372. Dawson, L.F., et al., *Characterisation of Clostridium difficile biofilm formation, a role for Spo0A*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50527.
373. Hamon, M.A. and B.A. Lazazzera, *The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2001. **42**(5): p. 1199-209.
374. Molle, V., et al., *The Spo0A regulon of Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1683-701.
375. Burns, D.A., J.T. Heap, and N.P. Minton, *SleC is essential for germination of Clostridium difficile spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate*. J Bacteriol, 2010. **192**(3): p. 657-64.
376. Miyata, S., et al., *A gene (sleC) encoding a spore-cortex-lytic enzyme from Clostridium perfringens S40 spores; cloning, sequence analysis and molecular characterization*. Microbiology, 1995. **141 ( Pt 10)**: p. 2643-50.
377. Vidal, J.E., et al., *The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by Streptococcus pneumoniae strain D39*. Infect Immun, 2011. **79**(10): p. 4050-60.
378. Xu, L., et al., *Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 488-96.

## **ANNEXE**

Annexe

## **“Characterization of Hospital-Associated Lineages of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* from Clinical Cases in Dogs and Humans”**

Cindy-Love Tremblay<sup>1</sup>, Audrey Charlebois<sup>1</sup>, Luke Masson<sup>2</sup>, and Marie Archambault<sup>1\*</sup>

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, clinical cases, antibiotic resistance, virulence, plasmid, hospital-associated, community-associated, MLST

<sup>1</sup>University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Microbiology, CRIPA research group, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada; <sup>2</sup>National Research Council of Canada, Biotechnology Research Institute, Montreal, H4P 2R2, Quebec, Canada.

\*Corresponding author: Marie Archambault, Tel: (1) 450-773-8521 ext 8679; Fax: (1) 450-778-8108

Publié dans : *Frontiers in Microbiology*, section Antimicrobials, resistance and chemotherapy, 2013

Détail sur le rôle de la candidate dans la conception de l'article : J'ai effectué toutes les expériences de MLST, les PCR pour les gènes *pbp5*, *gyrA/B* et *parC/E* ainsi que les expériences supplémentaires demandées pour la correction de l'article.

## Abstract

Ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* (ARE) has rapidly emerged worldwide and is one of the most important nosocomial pathogens. However, very few reports are available on ARE isolates from canine clinical cases. The objective of this study was to characterize ARE strains of canine clinical origin from a veterinary teaching hospital in Canada and to compare them with human strains. Ten ARE strains from dogs and humans were characterized by multilocus sequence typing (MLST), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), antibiotic susceptibility and biofilm activities, presence of *rep*-families, CRISPR-*cas* and putative virulence genes. All ARE strains ( $n = 10$ ) were resistant to ciprofloxacin and lincomycin. Resistances to tetracycline ( $n = 6$ ), macrolides ( $n = 6$ ), and to high concentrations of gentamicin, kanamycin and streptomycin ( $n = 5$ ) were also observed. Canine ARE isolates were found to be susceptible to vancomycin whereas resistance to this antibiotic was observed in human strains. Ampicillin resistance was linked to PBP5 showing mutations at 25 amino acid positions. Fluoroquinolone resistance was attributable to ParC, GyrA, and GyrB mutations. Data demonstrated that all canine ARE were *acm* (collagen binding protein)-positive and that most harbored the *efaA<sub>fm</sub>* gene, encoding for a cell wall adhesin. Biofilm formation was observed in two human strains but not in canine strains. Two to five *rep*-families were observed per strain but no CRISPR sequences were found. A total of six STs (1, 18, 65, 202, 205, and 803) were found with one belonging to a new ST (ST803). These STs were identical or closely related to human hospital-associated lineages. This report describes for the first time the characterization of canine ARE hospital-associated strains in Canada and also supports the importance of prudent antibiotic use in veterinary medicine to avoid zoonotic spread of canine ARE.



## Introduction

Multiresistant *Enterococcus faecium* has become one of the most important nosocomial pathogens, causing increasing numbers of nosocomial infections worldwide (Willems *et al.*, 2012). They now represent up to one-third of enterococcal infections (Willems and van Schaik, 2009). A multilocus sequence typing (MLST) study of *E. faecium* isolates revealed the existence of a distinct genetic subpopulation associated with nosocomial infections which was named clonal complex 17 (CC17) (Willems *et al.*, 2011). Recently, other studies (van Schaik *et al.*, 2010; van Schaik and Willems, 2010; de Regt *et al.*, 2012; Willems *et al.*, 2012) have indicated that these hospital-associated *E. faecium* (HA *E. faecium*) did not evolve from a single founder (i.e., sequence type (ST) 17) as there are now several founders identified. More recently, a Bayesian population genetic analysis revealed that HA *E. faecium* could be divided into three lineages originating from STs 17, 18 and 78, all ampicillin resistant and with variable resistance phenotypes to other antibiotics (Willems *et al.*, 2012).

Genome-wide analyses have shown that HA ARE have a genetic repertoire distinct from *E. faecium* strains that asymptotically colonize the intestinal tract of both humans and animals in the community (Leavis *et al.*, 2007; van Schaik *et al.*, 2010) and are found only sporadically among nonhospital isolates (Willems *et al.*, 2011). However, previous studies around the world (Damborg *et al.*, 2008; de Regt *et al.*, 2008; Ossiprandi *et al.*, 2008; Damborg *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2009; de Regt *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2012) have revealed that healthy dogs are known community reservoirs where some of these typical hospital clones seem to reside. Furthermore, HA ARE have been recovered from clinical cases of urinary tract infections in canines from the U.S. (Simjee *et al.*, 2002), Korea (Kwon *et al.*, 2012) and Denmark (Damborg *et al.*, 2008) and from feces of canines leaving the intensive care unit of an American veterinary medicine teaching hospital (Ghosh *et al.*, 2011). In general, only limited data is available on lineages and genotypic content of HA ARE from canine clinical isolates.

A recent report from Canadian human cases of HA ARE (McCracken *et al.*, 2013) has indicated that a shift in ST has occurred after 2006 and that around that time bacteraemia rates began to rise in central and western Canada, suggesting a possible correlation. Prior to 2006, predominant types included ST154, ST16, ST17 and ST80 and after 2006, ST18, ST203, ST412 and ST584 became predominant in Canada (McCracken *et al.*, 2013). In Canada, no data is available on ARE isolates from dogs with ST lineages causing nosocomial infections in humans. Thus, the goal of this study was to characterize canine ARE clinical isolates from Québec, Canada and to determine their STs. Also, HA ARE strains of human origin were used for comparison to assess possible genetic relationships between the two sets of strains. This study underscores the importance of canines as potential reservoirs of multi-drug resistant HA ARE.

## Material and Methods

### Bacterial isolates and identification

Ten *E. faecium* strains were used in this study (Table 1). Dog' strain isolation criteria were the presence of a relatively recent (2007-2012) clinical infection, isolation in pure culture, and PCR identification as *E. faecium* species. Based on these criteria only five canine *E. faecium* isolates were recovered over this period from the diagnostic laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine at the University of Montreal and these were from UTI, wounds and cholangiohepatitis infections. The human isolates ( $n = 5$ ) were provided by the "Centre de Recherche Hospitalier de l'Université Laval (CRCHUL)" and randomly chosen from a culture collection of *E. faecium* from hospitalized patients over the same period. Some of the human isolates (CCRI no. 18581, 16717 and 16354) were from colonization/surveillance studies of hospitalized patients. All isolates were identified by multiplex PCR assay using species-specific primer sets for the *ddl faecium* (*ddl* F-5'TTGAGGCAGACCAGATTGACG3' and *ddl* R-5'TATGACAGCGACTCCGATTCC3') identification gene as previously described (Tremblay *et al.*, 2011). *E. faecium* HA-56038 was used as a positive control.

### Antibiotic susceptibility testing

Isolates were tested for MIC using the Sensititre plate CMV3AGPF (Trek™ Diagnostic System Ltd, Cleveland, OH) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M31-A3 and M100-S20) guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010). Ciprofloxacin and ampicillin susceptibilities were further analyzed by standard broth macrodilution method (CLSI, M31-A3 and M100-S20). Breakpoints from CLSI and the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) were used (Anonymous, 2008). *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC29212 were used as control strains.

### **PFGE and MLST**

Isolates were analyzed for clonal diversity by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *Sma*I (New England Biolabs, Inc., Beverly, Ma, USA) digestion as described by Garcia-Migura *et al.* (Garcia-Migura *et al.*, 2005). Digested DNA was electrophoresed as previously described (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Computer analysis of PFGE banding patterns was performed with Bionumerics Version 6.5 software (Applied Maths, Austin, TX, USA). Banding pattern similarities were analyzed by the Dice coefficient, and cluster analysis was performed by the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA). PFGE types were determined as  $\geq 80$  % similarity. MLST was based on seven *E. faecium* housekeeping genes (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purk*, *gyd*, *pstS*, and *adk*). Different sequences were assigned allele numbers, and different allelic profiles were assigned STs based on the MLST database (<http://www.mlst.net/databases/>). Analysis was performed using the eBURST version 3 algorithm implemented as a Java applet at <http://eburst.mlst.net>.

### **DNA Microarrays**

Microarray hybridization experiments were performed as previously described (Champagne *et al.*, 2011). This enterococcal virulence microarray was developed (Diarra *et al.*, 2010b) at the National Research Council in Montreal and carries 70 taxonomic probes for species identification as well as 15 virulence factors, and 173 antibiotic resistance probes for a total of 262 probes. The microarray was used for the detection of putative target genes. Briefly, bacterial DNA isolated from single colonies was labelled with Cy5-dCTP (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Hybridization, washing, scanning, image processing, scoring, and data analysis were done as previously described (Champagne *et al.*, 2011). Arrays were scanned by a ScanArray Express microarray Scanner (Packard Biosciences, Billerica, MA, USA). Oligonucleotide spots with a signal-to-noise fluorescence ratio above 3 were considered positive. Positive microarray results were confirmed by PCR with specific primers for the following genes *tet*(M), *tet*(O), *tet*(L), *erm*(B), *agg* and *esp* (Table 2). Since *erm*(AM) and *erm*(B) shared over 80 % similarity and are perfectly correlated, they were considered as the same in this study as previously proposed (Roberts *et al.*, 1999).

### **PCR detection of virulence and antibiotic resistance genes**

PCR amplifications of virulence genes *acm* and *hyl* and of the quinolone resistance-determining regions (QRDR) genes were performed as previously described (Nallapareddy *et al.*, 2003; Vankerckhoven *et al.*, 2004; Billstrom *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2010). The N-terminal and C-terminal regions of the *pbp5* gene were amplified by PCR (Aarestrup *et al.*, 2002; Poeta *et al.*, 2007). Both strands of the purified QRDRs and *pbp5* amplicon products were sequenced. Sequences of *gyrA/B* and *parC/E* were compared with the *E. faecium* DO genome (GenBank accession no. CP003583) whereas sequences of the C- and N-terminal regions of *pbp5* gene were compared with *pbp5* gene reference sequence (GenBank accession no. X84860).

### **PCR for *repA* genes (plasmid families)**

All isolates were screened for *rep*-like sequences by PCR as previously described (Jensen *et al.*, 2010) with few modifications (Table 2). Briefly, fourteen different *rep*-family plasmids (*rep*<sub>1-2</sub>, *rep*<sub>4</sub>, *rep*<sub>6</sub>, *rep*<sub>8-9</sub>, *rep*<sub>11</sub>, *rep*<sub>13-15</sub>, *rep*<sub>16-18</sub> and *rep*<sub>Unique</sub>) were tested for their presence in *E. faecium* isolates. The PCR amplified and sequenced amplicons from selected strains (*E. faecium* strain no. 07-5598, M2146-08, 18581 and 16717) from this study were used as positive controls for *rep*<sub>1-2</sub>, *rep*<sub>4</sub>, *rep*<sub>6</sub>, *rep*<sub>14</sub>, *rep*<sub>17-18</sub> and *rep*<sub>Unique</sub> whereas control strains for *rep*<sub>8-9</sub>, *rep*<sub>11</sub>, *rep*<sub>13</sub>, and *rep*<sub>15-16</sub> were from a previous study (Tremblay *et al.*, 2012). The families' *rep*<sub>3</sub>, *rep*<sub>5</sub>, *rep*<sub>7</sub>, *rep*<sub>10</sub>, and *rep*<sub>19</sub> could not be tested because no positive PCR products were obtained and no control strains were available.

### **Detection of CRISPR-*cas***

The CRISPR1-*cas* and CRISPR3-*cas* loci were screened by PCR as previously described (Palmer and Gilmore, 2010) with slight modifications. Briefly, the PCR reactions were performed in a total of 50 µL, using 80 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM each of dNTPs, 2 U of Taq DNA, 1X Buffer mix (New England Biolabs) and sample DNA. Amplification reactions were carried out using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Québec, Canada) programmed as follows: an initial denaturation step of 94°C for 2 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min and extension at 72°C for 1 min,

followed by a final elongation at 72°C for 5 min. For visualization, 5 µL of the PCR reaction were subjected to electrophoresis in 1.2 % agarose gel stained with ethidium bromide. A 100 bp ladder (TrackIt, Invitrogen, Ontario, Canada) was used as a marker. *Enterococcus faecalis* strain no. 02-A701 and 06-6225 were used as positive controls.

### **Biofilm formation**

Isolates were inoculated in tryptic soy broth (TSB) supplemented with 1 % glucose in 96 well microtiter plates (Fisher scientific) for bacterial growth and biofilm formation as described elsewhere (Zoletti *et al.*, 2011). Biofilm was quantified using crystal violet staining method as described by Zoletti *et al.* (Zoletti *et al.*, 2011). *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (biofilm producer) and wells containing uninoculated medium were used as controls. ODs were obtained using a microplate reader Biotek Synergy HT (Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) at a wavelength of 570 nm. Analyses were based on two different experiments where isolates were tested in triplicate. The quantification of biofilm formation in microtiter plates was performed as previously described (Stepanovic *et al.*, 2000; Stepanovic *et al.*, 2007). Briefly, strains were divided into the following categories: no biofilm producer (-), weak biofilm producer (+), moderate biofilm producer (++) and strong biofilm producer (+++), based upon the previously calculated OD values:  $OD \leq OD_c$  = no biofilm producer;  $OD_c < OD \leq 2X OD_c$  = weak biofilm producer;  $2X OD_c < OD \leq 4X OD_c$  = moderate biofilm producer;  $4X OD_c < OD$  = strong biofilm producer.  $OD_c$  is defined as three standard deviations (SD) above the mean OD of the negative control.

### **Statistical analysis**

A chi-square exact test was used to examine the association between isolate, origin, antibiotic resistance, virulence genes, biofilm formation, plasmid families and CRISPR genes. Statistical analyses were carried out using SAS software v. 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). The level of statistical significance was set at 0.05.

## Results

### MLST and PFGE

MLST allelic profiles are presented in Table 1. A total of six STs were found among the *E. faecium* isolates, ST1 ( $n = 1$ ), ST18 ( $n = 2$ ), ST65 ( $n = 1$ ), ST202 ( $n = 2$ ), ST205 ( $n = 1$ ) and one novel, ST803 (isolates M2146-08, M5853-09 and M20638-11) (Table 1). Canine ARE belonged to ST202 ( $n = 2$ ) and ST803 ( $n = 3$ ) both SLV of ST17. Human clinical isolates belonged to ST65 ( $n = 1$ ), a singleton known to be found only among clinical strains (Werner *et al.*, 2011), and ST205 ( $n = 1$ ), a SLV of ST17 (Table 1). Human surveillance isolates belonged to ST18 ( $n = 2$ ), and ST1 ( $n = 1$ , linked to CC1). Therefore, all these STs were linked to HA-ARE except for ST1 which was shown to belong to a cluster containing primarily isolates from calves in the Netherlands (<http://efaecium.mlst.net/>). Following genomic *Sma*I digestion and PFGE, the *E. faecium* isolates ( $n = 10$ ) of human and canine origins produced ten macro-restriction patterns clustered into eight PFGE types, termed A through H (Table 1). Canine *E. faecium* isolates of subtypes A and E were  $\geq 80$  % similar whereas the remaining *E. faecium* isolates were considered unrelated ( $\leq 80$  %). The *E. faecium* PFGE types B and H were set as a same group by MLST (ST18) whereas the new ST803 was grouped as PFGE types E and F (Table 1).

### Antibiotic resistance

Chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, lincomycin, tylosin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, penicillin, ampicillin, and tetracycline resistances were observed in *E. faecium* clinical isolates of canine origin with no resistance observed to daptomycin, linezolid, nitrofurantoin, quinupristin/dalfopristin, vancomycin and tigecycline (Tables 1 and 3). Resistances to ciprofloxacin, erythromycin, lincomycin, tylosin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, nitrofurantoin, penicillin, ampicillin, tetracycline and vancomycin but not to chloramphenicol, daptomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and tigecycline were observed in human *E. faecium* clinical isolates (Tables 1 and 3). All *E. faecium* isolates were resistant to ampicillin, ciprofloxacin and lincomycin. Seven isolates were considered as high-level ciprofloxacin-resistant (MICs of  $> 16$   $\mu\text{g/mL}$ ) whereas nine isolates showed high-

level ampicillin resistance (MICs of  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ ) (Table 3). Also, erythromycin resistance ( $n = 6$ ) was positively associated ( $p$ -value  $< 0.05$ ) with aminoglycoside resistance ( $n = 6$ ), whereas ciprofloxacin resistance ( $n = 10$ ) correlated ( $p$ -value  $< 0.05$ ) with ampicillin ( $n = 9$ ) resistances. All vancomycin resistant *E. faecium* ( $n = 3$ ) isolates were of human origin.

### Microarray and PCR analysis of virulence and antibiotic resistance genes

Virulence and antibiotic resistant genotypes are presented in Table 1. Results demonstrated all canine ARE isolates were *acm*-positive but were negative for *esp* and *hyl* genes. The majority of these isolates were shown to harbor *efaA<sub>fm</sub>* gene, encoding for a cell wall adhesin. One canine ARE isolate also had the *agg* gene encoding for an aggregation substance of pheromone-responsive plasmid. The *efaA<sub>fm</sub>* gene was detected in all human isolates but one. The two human clinical isolates (CCRI-18707 and -18231) were also positive for the glycosyl hydrolase gene (*hyl*). Acquisition of multiple antibiotic resistance genes was observed ranging from 2 to 14 per isolate. Correlation between MICs and the presence of resistance genes has indicated that tetracycline resistance was attributable to *tet(M)* ( $n = 2$ ); *tet(M)* and *tet(L)* ( $n = 3$ ); and *tet(M)*, *tet(L)* and *tet(O)* ( $n = 2$ ). Resistance to erythromycin, lincomycin and tylosin could be explained by the presence of *msrC*, *erm(AM)/erm(B)* in all strains with the exception of one (07-5598). Streptomycin resistance was associated with the *aadE* gene in all strains except one (07-5598). Kanamycin resistance was explained by *aph(3')-IIIa* in all strains except two (07-5598 and M2971-08) whereas gentamicin resistance was attributable to *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* in all strains but two (07-5598 and CCRI-16717). Chloramphenicol resistance ( $n = 1$ ) could not be explained because both *cat* and *floR* genes were absent in the two canine ARE resistant isolates. The gene *aac(6')-Ii* is intrinsic in *E. faecium* and confers resistance to low-level aminoglycosides. Also, the transposase genes *trans* and *transI* (both GenBank accession no. AF516335) associated with transposons Tn1546 and Tn5405-like on the plasmid pUW786 carrying multiresistance gene cluster were identified in many isolates ( $n = 9$ ). A correlation ( $p$ -value  $< 0.05$ ) was observed between *aadE* (high-level streptomycin resistance), *aph(3')-IIIa*, (aminoglycoside resistance), *sat(4)* (streptothricin acetyltransferase) and *IS1182* transposase gene (also



associated with plasmid pUW786) in human isolates of *E. faecium* (Diarra *et al.*, 2010a). The antibiotic resistance genes *erm*(AM)/*erm*(B) (macrolide-lincosamide-streptogramin B, MLS<sub>b</sub>), *aadE*, *sat*(4), *aph*(3')-IIIa were significantly ( $p$ -value < 0.05) associated with human isolates. Positive associations ( $p$ -value < 0.05) were observed between *transI* and *IS150* transposase genes, *aac*(6')-Ie-*aph*(2'')-Ia (encoding for a bi-functional aminoglycoside-modifying enzyme) and *erm*(AM)/*erm*(B). No beta-lactamase genes were detected in this study.

### Screening for *gyrA/B* and *parC/E* mutations

*E. faecium* isolates spanned a range of ciprofloxacin MICs from 4 µg/mL to > 256 µg/mL with seven isolates considered as high-level ciprofloxacin-resistant (MICs of > 16 µg/mL) (Table 3). High-level ciprofloxacin resistance was attributable to ParC (Ser80 → Arg, Ile or Asp; and Asn73 → Asp) and GyrA (Ser83 → Arg, Tyr, or Ile; Met127 → Trp; and Glu87 → Lys) mutations (Table 4). All high-level ciprofloxacin-resistant isolates had mutations in both GyrA (Ser83 → Arg or Tyr or Ile) and ParC (Ser80 → Arg or Ile or Asp). Corresponding fragments of subunits B (*parE/gyrB*) were also investigated. Two isolates demonstrated mutations in GyrB (Asp436 → Asn, Leu371 → Trp and Pro455 → Ser) whereas no changes in ParE were detected (Table 4). Isolates with MICs of < 16 µg/mL did not harbour mutational changes.

### Sequence analysis of *pbp5*

Nine isolates showed high-level ampicillin resistance (MICs of ≥ 256 µg/mL) with all canine ARE being high-level. Both the N-terminal and C-terminal regions were analyzed and revealed that PBP5 contained 25 amino acid changes, as shown in Table 5. The insertion of aspartic acid at position 466' was mostly observed in isolates of animal origin. Alleles were designated 1-5 based on important amino acid substitutions in the C-terminal region with none showing 100 % identity with the reference sequence (GenBank accession no. X84860). The same *pbp5* alleles (alleles 1 and 2) were observed in clonal isolates with PFGE patterns A1 and A2 and E1 and E2.

### ***repA* genes (plasmid families)**

Nine different *rep*-family plasmid genes (*rep*<sub>1-2</sub>, *rep*<sub>4</sub>, *rep*<sub>6</sub>, *rep*<sub>11</sub>, *rep*<sub>14</sub>, *rep*<sub>17-18</sub> and *rep*<sub>Unique</sub>) were detected in *E. faecium* isolates (Table 1). The predominant *rep*-family among *E. faecium* isolates was *rep*<sub>11</sub> (pEF1071) with seven isolates. Other *rep*-families were also observed: *rep*<sub>1</sub> (pIP501) (*n* = 2), *rep*<sub>2</sub> (pRE25) (*n* = 6), *rep*<sub>4</sub> (pMBB1) (*n* = 1), *rep*<sub>6</sub> (pS86) (*n* = 5), *rep*<sub>14</sub> (pRI1) (*n* = 5), *rep*<sub>17</sub> (pRUM) (*n* = 3), *rep*<sub>18</sub> (pEF418) (*n* = 1) and *rep*<sub>Unique</sub> (pUB101) (*n* = 3). Overall, *rep*<sub>11</sub> and *rep*<sub>6</sub> families were significantly (*p*-value < 0.05) associated with isolates of canine origin. The families' *rep*<sub>8-9</sub>, *rep*<sub>13</sub>, and *rep*<sub>15-16</sub> were not detected.

### **CRISPR-*cas* genes**

To determine whether there is an association between CRISPR elements and plasmid family genes, virulence and/or antibiotic resistance genes, CRISPR-*cas* genes were investigated by PCR. Because potential sequence divergence among *csnI* genes, an internal region of CRISPR-*cas* locus-specific genes, may lead to false-negative PCR results, isolates with negative PCR results were further screened with primers flanking the conserved locations of the CRISPR1-*cas* and CRISPR3-*cas* loci, between homologues of EF0672-EF0673 and EF1760-EF1759, respectively, as compared with the *E. faecalis* genome V583 (Palmer and Gilmore, 2010). According to Palmer and Gilmore (2010), one CRISPR-*cas* locus was identified in three *E. faecium* genomes. However, this locus could not be detected in our ten ARE strains. No significant correlations could be made with the absence of antibiotic resistance, virulence, and plasmid family genes due to low number of isolates.

### **Biofilm formation**

Both isolates producing biofilm were recovered from infections, one weak and one strong both harboring the *esp* gene (Table 1), contrasting with those from surveillance. However, one ARE isolate which colonized a hospitalized patient was positive for the *esp* gene and did not produce a biofilm.

## Discussion

To the best of our knowledge, we describe for the first time, the characterization of ARE strains of canine origin from Canada with STs identical (ST202) or closely related (ST803) to human hospital-associated lineages. Colonization by major clones is relatively rare in healthy humans (de Regt *et al.*, 2012). The presence in canine clinical cases of identical or closely related ARE clones currently involved in the nosocomial epidemiology supports the hypothesis that, cross-transmission between humans and dogs may potentially occur. This is also why it was decided to fully characterize these dog strains and compare them with human strains from Canada. In canines, reports have indicated that ARE most frequently were of ST266 origin but that a variety of STs associated with human clinical infections could also be found (Damborg *et al.*, 2008; Damborg *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2011; de Regt *et al.*, 2012). These findings, along with the current study, present evidence of some genotypic concordance, based on MLST, between hospital clones of human origin and community ARE from clinical cases of dogs, indicating that these isolates are likely evolutionarily linked. This has also been previously suggested by a phylogenomic analysis of two dog strains and seven sequenced *E. faecium* genomes derived from humans (de Regt *et al.*, 2012). Similar to a study on Dutch canine ARE isolates (de Regt *et al.*, 2012), canine ARE isolates in our study were not an ‘exact copy’ to those in the circulating Canadian hospital reservoir as none of the human predominant types in Canada (McCracken *et al.*, 2013) were identified in these isolates. This could also be because the number of isolates of this study was limited.

In humans, the emergence of high-level ampicillin resistance, specifically in US hospitals in the early 1980s, preceded the epidemic rise of vancomycin resistance, which occurred in the 1990s, explaining why virtually all vancomycin-resistant enterococci (VRE) recovered from nosocomial infections in humans are also ampicillin resistant (Grayson *et al.*, 1991; Iwen *et al.*, 1997). In this study, the transposase genes *trans* and *trans1*, associated with Tn1546, were present in strains of canine origin which were all susceptible to vancomycin. This could be explained by possible mutations or deletions within this transposon causing the susceptible

phenotype in canine isolates. Because the association between ampicillin and vancomycin resistance phenotypes in humans probably reflects sequential and independent acquisition of resistance genes resulting in the selective dominance of a small subset of hospital-adapted clones (Willems *et al.*, 2011), care should be taken to completely withdraw vancomycin from veterinary medicine and to perform detailed surveillance studies on possible anthro-po-zoonotic transfer of ARE.

In this study, the high-level ciprofloxacin and ampicillin resistances observed were associated respectively with previously reported amino acid changes in topoisomerase IV, DNA gyrase and in PBP5 (Ligozzi *et al.*, 1996;Zorzi *et al.*, 1996;Rice *et al.*, 2001;Jureen *et al.*, 2003;Werner *et al.*, 2010). To our knowledge, previous studies did not observe mutations in the *gyrB* target (Leavis *et al.*, 2006;Werner *et al.*, 2010;Valdezate *et al.*, 2012). The contribution of these amino acid changes in GyrB to ciprofloxacin resistance is difficult to evaluate because amino acid changes in GyrA and ParC alone are sufficient to confer high-level resistance to ciprofloxacin. Other resistance mechanisms may be responsible for (low-level) ciprofloxacin resistance in HA ARE isolates that do not contain amino acid changes in the QRDRs of ParC and GyrA. Recently, characterization of EfmA, a multidrug efflux pump conferring resistance to quinolones and macrolides, from *E. faecium* has been described (Nishioka *et al.*, 2009) which could explain low-level ciprofloxacin resistance in some of the isolates of this study.

So far, canine ARE have been shown to carry fewer virulence traits (de Regt *et al.*, 2012;Kwon *et al.*, 2012) compared to human HA ARE (Top *et al.*, 2008;Werner *et al.*, 2010). It was also shown in a recent report that canine *E. faecium* did not form biofilms and lacked the strong gelatinase phenotype as well as *esp* (Ghosh *et al.*, 2011). Also, as observed in our study, ARE strains that colonize the gastrointestinal tract of humans have been shown to carry less determinants such as the enterococcal surface protein, Esp (Coque *et al.*, 2002;Heikens *et al.*, 2007), genomic islands (Heikens *et al.*, 2008), and insertion sequence elements (Leavis *et al.*, 2007). Recently, a sequence-based classification system for enterococcal plasmids has been established which targets replicon-specific plasmid DNA to determine 19 plasmid

families which are associated with either a very narrow or a broader host range (Jensen *et al.*, 2010). This procedure was attempted to determine whether specific plasmid families were involved in ARE of canine origin versus human origin. In this study, *rep*<sub>6</sub> (small cryptic plasmids) and *rep*<sub>11</sub> (toxin producing plasmids) plasmid families were significantly associated with isolates from dogs. Interestingly, it was also observed that these two families seem to be associated with human isolates from colonization (CCRI no. 18581, 16717 and 16354) but due to low number of isolates this statistical significance could not be addressed. No significant association between *rep* families and antimicrobial resistance genes could be identified for isolates of canine origin whereas the human clinical strains were significantly associated ( $p < 0.05$ ) with *erm*(B)/*erm*(AM), *aadE*, *sat*(4), *aph*(3')-IIIa, IS1182 and with the *rep*<sub>17</sub> plasmid family which has been previously reported (Grady and Hayes, 2003). Interestingly, these genes were also detected in a surveillance human isolate. Recently, a significant correlation between the absence of CRISPR-*cas* loci and the presence of antibiotic-resistance genes was previously described for *E. faecalis* (Palmer and Gilmore, 2010). This tendency was also observed in ARE of this study but due to the low number of isolates its significance could not be determined. Further research is needed to assess the virulence and the antimicrobial resistance of canine strains in comparison with that of human strains and, more generally, to quantify the magnitude of this possible emerging zoonotic problem.

In conclusion, the current study provides the first characterization of canine clinical ARE isolates in Canada with STs identical or closely related to human clinical isolates. This analysis, as well as previous reports, further indicates that canine ARE isolates are evolutionarily linked with hospital ARE isolates with some discordance in their multi-drug resistance and virulence attributes. These findings also support the importance of prudent use of antibiotics in veterinary medicine to avoid zoonotic spread and development of vancomycin resistance of canine ARE isolates. Select and spread of HA-strains that can cause human infections is a major concern, independently of being VRE, because in some countries ARE associated with human infections remain vancomycin susceptible. Further studies are needed to understand the significance of dogs in the spread of this nosocomial pathogen in the community.

The occurrence of ARE in dogs and other domestic animals could be addressed by national programs in order to explore the importance of the animal reservoir in the evolution of human hospital ARE isolates.

**Acknowledgments**

This work was funded partly by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461) and the Public Health Agency of Canada (*in kind*). We want to thank Dr. Maurice Boissinot from the Research Center of Laval University for providing human clinical isolates. We want to thank the Diagnostic Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of University of Montreal to provide animal clinical isolates. We also thank Guy Beauchamp at the Faculty of Veterinary Medicine of University of Montreal for his help in statistical analysis.

## References

- Aarestrup, F.M. (2000). Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J Clin Microbiol* 38, 2774-2777.
- Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen, L.B., Moreno, M., Herrero, I.A., Dominguez, L., Finn, M., and Franklin, A. (2002). Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl Environ Microbiol* 68, 4127-4129.
- Anonymous (2008). "Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA)". (Guelph: Agence de la santé publique du Canada).
- Billstrom, H., Lund, B., Sullivan, A., and Nord, C.E. (2008). Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents* 32, 374-377.
- Champagne, J., Diarra, M.S., Rempel, H., Topp, E., Greer, C.W., Harel, J., and Masson, L. (2011). Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. *Appl Environ Microbiol* 77, 2625-2633.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition. *CLSI document M31-A3* Vol. 28 No.8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard- Twentieth Informational Supplement. *CLSI document M 100-S20* Vol. 31 No. 1.
- Coque, T.M., Willems, R., Canton, R., Del Campo, R., and Baquero, F. (2002). High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother* 50, 1035-1038.



- Damborg, P., Sorensen, A.H., and Guardabassi, L. (2008). Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Vet Microbiol* 132, 190-196.
- Damborg, P., Top, J., Hendrickx, A.P., Dawson, S., Willems, R.J., and Guardabassi, L. (2009). Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl Environ Microbiol* 75, 2360-2365.
- De Leener, E., Martel, A., Decostere, A., and Haesebrouck, F. (2004). Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist* 10, 341-345.
- De Regt, M.J., Van Der Wagen, L.E., Top, J., Blok, H.E., Hopmans, T.E., Dekker, A.W., Hene, R.J., Siersema, P.D., Willems, R.J., and Bonten, M.J. (2008). High acquisition and environmental contamination rates of CC17 ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in a Dutch hospital. *J Antimicrob Chemother* 62, 1401-1406.
- De Regt, M.J., Van Schaik, W., Van Luit-Asbroek, M., Dekker, H.A., Van Duijkeren, E., Koning, C.J., Bonten, M.J., and Willems, R.J. (2012). Hospital and community ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* are evolutionarily closely linked but have diversified through niche adaptation. *PLoS One* 7, e30319.
- Diarra, M.S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., and Topp, E. (2010a). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 76, 8033-8043.
- Diarra, M.S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., and Topp, E. (2010b). Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp: Characterization of Isolates from Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol*.
- Garcia-Migura, L., Pleydell, E., Barnes, S., Davies, R.H., and Liebana, E. (2005). Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from

- broiler poultry and pig farms in England and Wales. *J Clin Microbiol* 43, 3283-3289.
- Ghosh, A., Dowd, S.E., and Zurek, L. (2011). Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS One* 6, e22451.
- Grady, R., and Hayes, F. (2003). Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Mol Microbiol* 47, 1419-1432.
- Grayson, M.L., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C.B., Ruoff, K.L., De Girolami, P.C., Ferraro, M.J., and Moellering, R.C., Jr. (1991). Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 2180-2184.
- Heikens, E., Bonten, M.J., and Willems, R.J. (2007). Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 189, 8233-8240.
- Heikens, E., Van Schaik, W., Leavis, H.L., Bonten, M.J., and Willems, R.J. (2008). Identification of a novel genomic island specific to hospital-acquired clonal complex 17 *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol* 74, 7094-7097.
- Iwen, P.C., Kelly, D.M., Linder, J., Hinrichs, S.H., Dominguez, E.A., Rupp, M.E., and Patil, K.D. (1997). Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 494-495.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Davis, J.A., Barrett, J.B., and Frye, J.G. (2009). Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J Appl Microbiol* 107, 1269-1278.
- Jensen, L.B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A.J., Lohr, M., Hasman, H., and Aarestrup, F.M. (2010). A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods* 80, 25-43.
- Jureen, R., Top, J., Mohn, S.C., Harthug, S., Langeland, N., and Willems, R.J. (2003). Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus*

- faecium* isolates from hospitalized patients in Norway. *J Clin Microbiol* 41, 2330-2336.
- Kwon, K.H., Moon, B.Y., Hwang, S.Y., and Park, Y.H. (2012). Detection of CC17 *Enterococcus faecium* in Dogs and a Comparison with Human Isolates. *Zoonoses Public Health* 59, 375-378.
- Leavis, H.L., Willems, R.J., Top, J., and Bonten, M.J. (2006). High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 44, 1059-1064.
- Leavis, H.L., Willems, R.J., Van Wamel, W.J., Schuren, F.H., Caspers, M.P., and Bonten, M.J. (2007). Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog* 3, e7.
- Ligozzi, M., Pittaluga, F., and Fontana, R. (1996). Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 354-357.
- Mccracken, M., Wong, A., Mitchell, R., Gravel, D., Conly, J., Embil, J., Johnston, L., Matlow, A., Ormiston, D., Simor, A.E., Smith, S., Du, T., Hizon, R., and Mulvey, M.R. (2013). Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1999-2009. *J Antimicrob Chemother*.
- Nallapareddy, S.R., Weinstock, G.M., and Murray, B.E. (2003). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 47, 1733-1747.
- Nishioka, T., Ogawa, W., Kuroda, T., Katsu, T., and Tsuchiya, T. (2009). Gene cloning and characterization of EfmA, a multidrug efflux pump, from *Enterococcus faecium*. *Biol Pharm Bull* 32, 483-488.
- Ossiprandi, M.C., Bottarelli, E., Cattabiani, F., and Bianchi, E. (2008). Susceptibility to vancomycin and other antibiotics of 165 *Enterococcus* strains isolated from dogs in Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31, 1-9.

- Palmer, K.L., and Gilmore, M.S. (2010). Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio* 1.
- Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Saenz, Y., Zarazaga, M., Rodrigues, J., and Torres, C. (2007). Polymorphisms of the *pbp5* gene and correlation with ampicillin resistance in *Enterococcus faecium* isolates of animal origin. *J Med Microbiol* 56, 236-240.
- Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., and Torres, C. (2005). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int J Antimicrob Agents*.
- Rice, L.B., Carias, L.L., Hutton-Thomas, R., Sifaoui, F., Gutmann, L., and Rudin, S.D. (2001). Penicillin-binding protein 5 and expression of ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1480-1486.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., and Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2823-2830.
- Seno, Y., Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Monden, K., and Kumon, H. (2005). Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama* 59, 79-87.
- Simjee, S., White, D.G., Mcdermott, P.F., Wagner, D.D., Zervos, M.J., Donabedian, S.M., English, L.L., Hayes, J.R., and Walker, R.D. (2002). Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J Clin Microbiol* 40, 4659-4665.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., and Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40, 175-179.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115, 891-899.

- Top, J., Willems, R., and Bonten, M. (2008). Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 297-308.
- Tremblay, C.L., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., Daignault, D., and Archambault, M. (2011). Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of *tetO* and *ermB* Genes. *J Food Prot* 74, 1639-1648.
- Tremblay, C.L., Letellier, A., Quessy, S., Daignault, D., and Archambault, M. (2012). Antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* in abattoir pigs and plasmid colocalization and cotransfer of *tet(M)* and *erm(B)* genes. *J Food Prot* 75, 1595-1602.
- Valdezate, S., Miranda, C., Navarro, A., Freitas, A.R., Cabrera, J.J., Carrasco, G., Coque, T.M., Jimenez-Romano, E., and Saez-Nieto, J.A. (2012). Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like::Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 67, 832-836.
- Van Schaik, W., Top, J., Riley, D.R., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J.E., Schapendonk, C.M., Hendrickx, A.P., Nijman, I.J., Bonten, M.J., Tettelin, H., and Willems, R.J. (2010). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* 11, 239.
- Van Schaik, W., and Willems, R.J. (2010). Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin Microbiol Infect.*
- Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Swings, J., Klare, I., Witte, W., Van Autgaerden, T., Chapelle, S., Lammens, C., and Goossens, H. (2008). Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol* 74, 4247-4255.
- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., and Goossens, H. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey

- for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 42, 4473-4479.
- Werner, G., Fleige, C., Ewert, B., Laverde-Gomez, J.A., Klare, I., and Witte, W. (2010). High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int J Antimicrob Agents* 35, 119-125.
- Werner, G., Fleige, C., Geringer, U., Van Schaik, W., Klare, I., and Witte, W. (2011). IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect Dis* 11, 80.
- Willems, R.J., Hanage, W.P., Bessen, D.E., and Feil, E.J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35, 872-900.
- Willems, R.J., Top, J., Van Schaik, W., Leavis, H., Bonten, M., Siren, J., Hanage, W.P., and Corander, J. (2012). Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* 3, e00151-00112.
- Willems, R.J., and Van Schaik, W. (2009). Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol* 4, 1125-1135.
- Zoletti, G.O., Pereira, E.M., Schuenck, R.P., Teixeira, L.M., Siqueira, J.F., Jr., and Dos Santos, K.R. (2011). Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 162, 151-158.
- Zorzi, W., Zhou, X.Y., Dardenne, O., Lamotte, J., Raze, D., Pierre, J., Gutmann, L., and Coyette, J. (1996). Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 178, 4948-4957.

**Table 1.** Characterization of *E. faecium* isolates from human and canine enterococcal infections.

Isolate no.	Host <sup>a</sup>	Sources	Phenotypic resistance <sup>b</sup>	Antibiotic and related resistance gene <sup>c</sup>	Virulence gene	Biofilm formation	Rep-family	PFGE pattern	ST group	MLST allelic profile						
										<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
07-5598	D	Wound	CHL, CIP, ERY, GEN, KAN, LIN, AMP, PEN, STR, TET, TYL	<i>aac(6')-Ii, tet(M), tet(L), trans, trans1</i>	<i>acm</i>	-	2, 11, 18	A1	202	1	1	1	1	1	7	1
M2971-08	D	Wound	CIP, ERY, GEN, KAN, LIN, AMP, PEN, STR, TET, TYL	<i>aac(6')-Ii, aadE, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, msrC, tet(M), tet(L), tet(O), trans, trans1, IS150</i>	<i>efaA<sub>fm</sub>, acm</i>	-	2, 6, 11	A2	202	1	1	1	1	1	7	1
M2146-08	D	Bile	CIP, LIN, AMP, PEN, TET	<i>aac(6')-Ii, tet(M), tet(L), tet(O), msrC, trans, trans1, IS150</i>	<i>efaA<sub>fm</sub>, acm</i>	-	2, 6, 11, 14	E1	803	1	1	1	1	1	57	1
M5853-09	D	Urine	CIP, LIN, AMP, PEN, TET	<i>aac(6')-Ii, msrC, tet(M), tet(L), trans, trans1</i>	<i>agg, efaA<sub>fm</sub>, acm</i>	-	2, 6, 11, 14	E2	803	1	1	1	1	1	57	1
M20638-11	D	Urine	CIP, LIN, AMP, PEN	<i>aac(6')-Ii, msrC, trans1</i>	<i>efaA<sub>fm</sub>, acm</i>	-	6, 11, 14	F	803	1	1	1	1	1	57	1
CCRI-18581	H	Anal	CIP, ERY, KAN, LIN, AMP, PEN, STR, TET, TYL, VAN	<i>aac(6')-Ii, aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), sat(4), erm(B), msrC, tet(M), vanA, vanH, vanR, vanS, vanX, vanY, trans, trans1, IS1182, IS150</i>	<i>esp, acm</i>	-	11, 14, 17, Unique	H	18	7	1	1	1	5	1	1
CCRI-16354	H	Rectal	CIP, LIN, AMP, PEN, VAN	<i>aac(6')-Ii, msrC, tet(M), vanB1, trans, trans1, IS150</i>	<i>efaA<sub>fm</sub>, acm</i>	-	1, 2, 14	B	18	7	1	1	1	5	1	1
CCRI-16717	H	Stools	CIP, ERY, GEN, KAN, LIN, AMP, NIT, STR, TET, TYL, VAN	<i>aac(6')-Ii, aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), erm(B), sat(4), msrC, tet(M), tet(L), vanA, vanH, vanR, vanS, vanX, vanY, res, trans, IS1182</i>	<i>efaA<sub>fm</sub>, acm</i>	-	1, 2, 4, 6, 11	D	1	8	4	5	7	1	1	5
CCRI-18707	H	Pus	CIP, ERY, GEN, KAN, LIN, AMP, PEN, STR, TYL	<i>aac(6')-Ii, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), sat(4), erm(B), msrC, trans, trans1, IS1182, IS150</i>	<i>efaA<sub>fm</sub>, esp, acm, hyl</i>	+	17, Unique	C	65	1	2	1	20	1	1	9
CCRI-18231	H	Wound	CIP, ERY, GEN, KAN, LIN, AMP, PEN, STR, TYL	<i>aac(6')-Ii, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), erm(B), sat(4), msrC, trans, trans1, IS1182, IS150</i>	<i>efaA<sub>fm</sub>, esp, acm, hyl</i>	+++	17, Unique	G	205	3	1	1	1	1	1	1

<sup>a</sup> D, dogs; H, humans. AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; LIN, lincomycin; NIT, nitrofurantoin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TYL, tylosin; VAN, vancomycin.

<sup>c</sup> Identified by microarray; *aac(6')-Ii* is intrinsic resistance in *E. faecium*.

**Table 2.** Primers and conditions used in PCR for confirmation of microarray results and for *rep*-like genes identification.

Gene detected or Rep-family no. <sup>a</sup>	Primers (5' to 3') <sup>b</sup>	Amplicon (bp)	Annealing (T°C)	Reference or GenBank no.
<i>tet</i> (M)	F-GTGGACAAAGGTACAACGAG R-CGGTAAAGTTCGTACACAC	406	55	(De Leener <i>et al.</i> , 2004)
<i>tet</i> (O)	F-GATGGCATAACAGGCACAGAC R-CAATATCACCAGAGCAGGCT	614	62	(Aarestrup, 2000)
<i>tet</i> (L)	F-ATAAATTGTTTCGGGTCGGTAAT R-AACCAGCCAACTAATGACAAGT	1077	52	(De Leener <i>et al.</i> , 2004)
<i>erm</i> (B)	F-GAAAAGRTACTCAACCAAATA R-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	52	(Poeta <i>et al.</i> , 2005)
<i>agg</i>	F-GGTGCCACAATCAAATTAGG R-GATTCTTCGATTGTGTTGTAAACG	380	46	(Seno <i>et al.</i> , 2005)
<i>esp</i>	F-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC R-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	955	63	(Seno <i>et al.</i> , 2005)
1 (pIP501)	F-TCGCTCAATCACTACCAAGC R-CTTGAACGAGTAAAGCCCTT	624	52	X17655
9 (pCF10)	F-GCTCGATCARTTTTCAGAAG R-CGCAAACATTTGTCWATTTCTT	201		AY855841
4 (pMBB1)	F-ACTATGTCGTTGAGTCTAATGACT R-AGCAAGATAGAATATTTACTTTTAAGTTT	430		U26268
14 (pRI1)	F-RTTTTGRCTTTCTTSYTTCA R-TGAAAGYTTTRGATAGYTTTGC	164	52	EU327398
17 (pRUM)	F-TACTAACTGTTGGTAATTCGTTAAAT R-ATCAAGGACTCAACCGTAATT	502		EU376117
Unique (pMG1/pHTβ)	F-GTATTAACACACTGGACTC R-TCAGTGTAGGCAATAACCC	199	52	AB206333
2 (pRE25)	F-GAGAACCATCAAGGCGAAAT R-ACCAGAATAAGCACTACGTACAATCT	630		X92945
6 (pS86)	F-ACGAATGAAAGATAAAGGAGTAG R-TAAATTCTAGTTTGGCAATCTTAT	551	56	AJ223161
8 (pAM373)	F-CCAATCATGTAATGTTACAACC R-TAGATACGACAAAAGAAGATTACA	394		AE002565
18 (pEF418)	F-ACACCAGTCGAAATGAATTT R-AGGAATATCAAGTAATTCATGAAAGT	462		AF408195
13 (pC194)	F-TACCAGAATAYTTAGCCATTTT R-ATGATGCAATATATTAAGCA	402		V01277
15 (pUSA03)	F-CAGTAGAAGAAAATTATAAAGAAC R-GTTATGGCTGGTTTTAATAAA	327	54	CP000258
16 (pSAS)	F-CTTCTATATCACTATCATTGTCATT R-CAGGAAAACACTTCGTTTAT	592		BX571858



---

11 (pEF1071)	F-TCTAGAATGCGTGAAAAAGG R-CCTTTGAAGATWGCRGTWAG	500	54	AF164559
--------------	--	-----	----	----------

---

<sup>a</sup> Rep-family numbers are associated with plasmid in parenthesis.

<sup>b</sup> F, Forward; R, Reverse.

**Table 3.** Antibiotic resistance of *E. faecium* clinical isolates from humans and dogs based on MICs.

Antibiotic agent	Number of isolates at a MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) of <sup>b</sup> :																% resistant isolates (b)		
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	human	dog
Chloramphenicol							8	1	<b>1</b>									0 (0)	20 (1)
Daptomycin						7	3											0 (0)	0 (0)
Erythromycin						2	2		<b>6</b>									80 (4)	40 (2)
Gentamicin												5				<b>5</b>		60 (3)	40 (2)
Kanamycin												4				<b>6</b>		80 (4)	40 (2)
Lincomycin									<b>10</b>									100 (5)	100 (5)
Linezolid						9	1											0 (0)	0 (0)
Ciprofloxacin <sup>a</sup>							1	2			1	2		4				100 (5)	100 (5)
Nitrofurantoin										1	8	<b>1</b>						20 (1)	0 (0)
Ampicillin <sup>a</sup>											1	3	6					100 (5)	100 (5)
Penicillin					1					<b>9</b>								80 (4)	100 (5)
Streptomycin														4	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	80 (4)	40 (2)
Quinupristin/ dalfopristin				6	3	1												0 (0)	0 (0)
Tetracycline					4				<b>1</b>	<b>5</b>								40 (2)	80 (4)
Tylosin						3	1				<b>6</b>							80 (4)	40 (2)
Vancomycin				2	5					<b>3</b>								60 (3)	0 (0)
Tigecycline	5	5																0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup> Ciprofloxacin and ampicillin MICs from the standard broth macrodilution method.

<sup>b</sup> number of isolates; |, MIC breakpoint; bold numbers, numbers of resistant isolates; ||, susceptible breakpoint; unshaded areas, range of dilutions tested; numbers in the shaded area, isolates with MICs greater than the highest tested concentrations.

**Table 4.** Mutations in *gyrA/B* and *parC* of clinical *E. faecium* isolates with their corresponding ciprofloxacin MIC.

Ciprofloxacin MIC (µg/mL)	Isolate no.	Host <sup>a</sup>	Amino acid <sup>b</sup> mutation in gene (codon) :		
			<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>
4	M2146-08	D	None	None	None
8	M5853-09	D	None	None	None
8	CCRI-16717	H	None	None	None
64	M20638-11	D	I (83)	N (436)	R (80)
128	07-5598	D	Y (83), W (127)	None	I (80)
128	CCRI-18231	H	K (87)	None	I (80), D (73)
> 256	M2971-08	D	Y (83)	None	I (80)
> 256	CCRI-18581	H	Y (83)	None	R (80)
> 256	CCRI-16354	H	Y (83)	W (371), S (455)	I (80)
> 256	CCRI-18707	H	R (83)	None	I (80)

<sup>a</sup> D, dogs; H, humans.

<sup>b</sup> D, aspartic acid; I, isoleucine; K, lysine; N, asparagine; R, arginine; S, serine; W, tryptophan; Y, tyrosine.

**Table 5.** Amino acid changes detected in the C- and N-terminal regions of *pbp5* of clinical *E. faecium* isolates

MIC ampicillin (µg/mL)	Host <sup>a</sup>	<i>E. faecium</i>	Amino acid <sup>b</sup> change at position: <sup>c</sup>																				<i>pbp5</i> allele <sup>d</sup>				
			N-terminal											C-terminal													
			66	68	85	100	144	172	177	204	216	324	361	461	466'	470	476	485	496	497	499	525		586	615	629	643
-	-	X84860	G	A	E	E	K	T	L	D	A	T	G	Q	-	H	A	M	N	F	A	E	V	A	E	D	-
256	D	07-5598	NA	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	NA	Q	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	M	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	V	A	<b>V</b>	D	1
> 256	D	M2971-08	NA	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	NA	Q	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	M	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	V	A	<b>V</b>	D	1
> 256	H	CCRI-18581	NA	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	Q	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	M	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	V	A	<b>V</b>	NA	1
> 256	D	M2146-08	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	NA	Q	<b>D</b>	<b>Q</b>	A	<b>A</b>	<b>K</b>	F	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	A	<b>V</b>	<b>E</b>	2
> 256	D	M5853-09	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	NA	Q	<b>D</b>	<b>Q</b>	A	<b>A</b>	<b>K</b>	F	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	A	<b>V</b>	D	2
> 256	D	M20638-11	NA	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	G	Q	<b>D</b>	<b>Q</b>	A	<b>A</b>	<b>K</b>	F	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	A	<b>V</b>	D	2
64	H	CCRI-16717	NA	NA	E	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	D	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	Q	-	<b>Q</b>	A	M	<b>K</b>	F	<b>I</b>	<b>D</b>	V	A	E	D	3
> 256	H	CCRI-16354	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	NA	<b>K</b>	-	<b>Q</b>	A	<b>A</b>	<b>K</b>	F	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	A	<b>V</b>	D	4
256	H	CCRI-18707	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	-	<b>Q</b>	A	<b>A</b>	<b>K</b>	F	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	A	<b>V</b>	NA	4
256	H	CCRI-18231	NA	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	NA	Q	-	<b>Q</b>	A	<b>T</b>	<b>K</b>	F	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	D	5

NA, The sequence at this position was not available

<sup>a</sup> D, dogs; H, humans.

<sup>b</sup> A, alanine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; Q, glutamine; S, serine; T, threonine; V, valine.

<sup>c</sup> Amino acid changes with respect to the reference sequence (GenBank accession no. X84860) are indicated in bold.

<sup>d</sup> Alleles were designated 1-5 based on important amino acid substitutions in the C-terminal region.

