

Université de Montréal

**Identification et caractérisation des bactériocines de  
souches commensales de *Clostridium perfringens***

par Nicolas Deslauriers

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires, option sciences cliniques

Août, 2019

© Nicolas Deslauriers, 2019

Université de Montréal  
Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

*Ce mémoire intitulé*

**Identification et caractérisation des bactériocines de souches commensales de *Clostridium perfringens***

*Présenté par*

**Nicolas Deslauriers**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**M. Francis Beaudry**

Président-rapporteur

**Mme Martine Boulianne**

Directeur de recherche

**M. Frédéric Raymond**

Codirecteur

**Mme Évelyne Guévremont**

Membre du jury

## Résumé

Avec la présente augmentation de la résistance aux antibiotiques et l'inquiétude des consommateurs, de nouvelles alternatives sont nécessaires afin de contrôler l'entérite nécrotique (EN), une maladie causant des millions de dollars en pertes économiques pour l'industrie de la volaille mondialement. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par une bactérie pour tuer ou inhiber la croissance d'autres compétiteurs bactériens. La perfrine est la seule bactériocine reportée associée aux souches pathogènes de *Clostridium perfringens*, l'agent causal de l'EN. Les objectifs de cette étude étaient de détecter les souches commensales de *Clostridium perfringens* possédant une activité antimicrobienne contre des souches pathogènes de *C. perfringens* et d'identifier et caractériser les bactériocines produites. Les souches commensales de *C. perfringens* ont été sélectionnées à partir de notre banque de souches. L'activité antimicrobienne de ces souches a été testée contre des souches pathogènes de *C. perfringens* en utilisant la méthode d'inhibition sur gélose. Une souche commensale active démontrant une activité antimicrobienne a été cultivée et ses bactériocines ont été partiellement purifiées grâce à la précipitation au sulfate d'ammonium et par chromatographie (HPLC). À la suite de chaque chromatographie, l'activité antimicrobienne des fractions a été vérifiée en utilisant la méthode décrite précédemment afin de choisir les fractions contenant les bactériocines. La susceptibilité enzymatique, la stabilité à la chaleur et au pH et le poids moléculaire estimé des bactériocines ont été caractérisés. Les bactériocines étudiées étaient sensibles à la protéinase K, thermolabiles, stables à pH entre 4 et 8 et leur poids moléculaire étaient supérieur à 30 kDa. Le génome de la souche CP1676 a été séquencé et des analyses bio-informatiques ont été réalisées. Nous avons trouvé 28 séquences de bactériocines potentielles, mais seulement 4 d'entre elles semblaient être prometteuses. Dans cette étude, des souches commensales de *C. perfringens* produisant des bactériocines actives contre des souches pathogènes ont été identifiées. Ces bactériocines pourraient devenir une alternative intéressante aux antibiotiques afin de contrôler l'entérite nécrotique, mais davantage d'information est nécessaire.

**Mots-clés :** bactériocines, *Clostridium perfringens*, entérite nécrotique, purification, caractérisation

## Abstract

With the current increase in antimicrobial resistance and consumers' concern, new alternatives are needed to control necrotic enteritis (NE), a disease that causes billions of dollars in economic losses to the poultry industry worldwide. Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria to kill or inhibit the growth of other bacterial competitors. Perfrin is the only reported bacteriocin associated with pathogenic strains of *Clostridium perfringens*, the causal agent of NE. The aims of this study were to screen for commensal *Clostridium perfringens* strains with an antimicrobial activity against *C. perfringens* pathogenic strains and to identify and characterize the produced bacteriocins. Commensal *C. perfringens* strains were selected from our bacterial collection. Antimicrobial activity of those selected strains was tested against *C. perfringens* pathogenic strains using the agar spot test method. An active commensal strain showing antimicrobial activity was cultured and its bacteriocins were partially purified using the ammonium sulfate precipitation method and HPLC. After each chromatography, antimicrobial activity of fractions was tested using the method described above to choose fractions containing bacteriocins. Enzyme susceptibility, heat and pH stability and the estimated molecular weight of the bacteriocins were characterized. The studied bacteriocins were sensitive to proteinase K, thermolabile, stable at pH between 4 and 8 and their molecular weight higher than 30 kDa. CP1676 strain genome was sequenced and bioinformatics were performed. We found 28 potential bacteriocin sequences, but 4 of them seemed to be promising. In this study, commensal *C. perfringens* strains producing bacteriocins active against pathogenic strains have been identified. These bacteriocins could be an interesting alternative to antibiotics for the control of necrotic enteritis but further data is still needed.

**Keywords:** bacteriocins, *Clostridium perfringens*, necrotic enteritis, purification, characterization

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Recension des écrits.....	8
Article.....	8
Liste des figures.....	9
Recension des écrits.....	9
Article.....	9
Liste des sigles et abréviations.....	10
Remerciements.....	14
Introduction.....	15
Recension des écrits.....	17
1. <i>Clostridium perfringens</i> .....	17
1.1 Description du microorganisme.....	17
1.2 Le toxinotypage.....	19
1.3 Toxines et arsenal enzymatique.....	20
1.3.1 Toxine alpha ( $\alpha$ ).....	20
1.3.2 Toxine bêta ( $\beta$ ).....	21
1.3.3 Toxine epsilon ( $\epsilon$ ).....	21
1.3.4 Toxine iota ( $\iota$ ).....	22
1.3.5 Toxine Bêta 2 (CPB2).....	23
1.3.6 Entérotoxine (CPE).....	23
1.3.7 Entérotoxine binaire (BEC).....	24
1.3.8 Toxine thêta ( $\theta$ ).....	25
1.3.9 Toxines de l'entérite nécrotique (NetB).....	25
1.3.10 Autres toxines de l'entérite nécrotique (NetE, NetF et NetG).....	26
1.3.11 Toxine TpeL.....	27

1.3.12 Toxine delta ( $\delta$ ).....	27
1.3.13 Toxine kappa ( $\kappa$ ).....	28
1.3.14 Toxine lambda ( $\lambda$ ).....	28
1.3.15 Toxine mu ( $\mu$ ).....	29
1.3.16 Toxine nu ( $\nu$ ).....	29
1.3.17 Neuraminidases.....	30
1.4 Pathologies associées à <i>Clostridium perfringens</i> .....	32
1.4.1 Chez l'humain.....	32
1.4.1.1 Gangrène gazeuse.....	32
1.4.1.2 Toxi-infections alimentaires.....	32
1.4.2 Poulet.....	34
1.4.2.1 Entérite nécrotique.....	34
2. Bactériocines.....	35
2.1 Classification.....	36
2.1.1 Classe I.....	36
2.1.2 Classe II.....	36
2.1.3 Classe III.....	37
2.2 Mode d'action.....	37
2.3 Mécanisme d'auto-immunité.....	37
2.4 Biosynthèse.....	38
2.5 Régulation de la synthèse.....	41
2.6 Utilisations.....	41
2.6.1 Utilisation en tant qu'agent de conservation naturel.....	41
2.6.2 Utilisation en tant que probiotiques.....	42
2.6.3 Utilisation en tant qu'agents antimicrobiens.....	42
2.6.4 Utilisation en tant qu'agents anticancéreux.....	43
2.6.5 Administration.....	44
2.7 Bactériocines de <i>Clostridium perfringens</i> .....	44
2.7.1 SN-a et SN-b.....	45
2.7.2 N5.....	45
2.7.3 Bactériocine 28.....	45

2.7.4 BCN5 .....	45
2.7.5 Perfrine.....	46
3. Séquençage de l'ADN.....	46
3.1 Historique.....	46
3.2 Techniques de séquençage.....	47
3.2.1 Séquençage de première génération.....	47
3.2.2 Séquençage de deuxième génération .....	48
3.2.2.1 Roche 454 .....	48
3.2.2.2 Ion Torrent .....	49
3.2.2.3 Illumina/Solexa.....	50
3.2.2.4 ABI/SOLiD.....	51
3.2.3 Séquençage de troisième génération.....	52
3.2.3.1 PacBio.....	52
3.2.3.2 Séquençage par nanopore d'Oxford (ONT).....	52
4. Outils bio-informatiques .....	55
4.1 Banques de données.....	55
4.2 Outils bio-informatiques .....	55
4.2.1 Prodigal .....	56
4.2.2 NeuBI (« Neural Bacteriocin Identifier »).....	56
4.2.3 BLAST et ses variantes.....	57
Hypothèse et objectifs.....	59
Article .....	60
Abstract.....	61
Introduction.....	62
Materials et methods.....	63
Results.....	66
Discussion.....	67
Acknowledgements.....	70
References.....	70
Figures and tables .....	72
Discussion.....	79

Conclusion .....	85
Bibliographie.....	87

## Liste des tableaux

### Recension des écrits

Tableau 1. Résumé des toxines et de l'arsenal enzymatique de <i>Clostridium perfringens</i> . .	31
Tableau 2. Comparaison des diverses technologies de séquençage.....	54

### Article

Table 1. Selected <i>C. perfringens</i> commensal and pathogenic strains tested in this study .	75
Table 2. <i>C. perfringens</i> commensal strains showing antimicrobial activity against <i>C. perfringens</i> pathogenic strains. ....	76
Table 3. Characterization of the <i>C. perfringens</i> bacteriocin crude extract .....	77
Table 4. BLASTp alignments results of the predicted CP1676 bacteriocins .....	78

# Liste des figures

## Recension des écrits

Figure 1. Culture de <i>Clostridium perfringens</i> sur gélose Columbia montrant les deux types d'hémolyse causés par les toxines thêta et alpha.....	19
Figure 2. Biosynthèse des bactériocines de classe IIa.....	40
Figure 3. Rapport de résultat généré lors de l'analyse BLAST du gène de la toxine alpha de <i>Clostridium perfringens</i> .....	58

## Article

Figure 1. Agar spot test showing <i>C. perfringens</i> commensal strains antimicrobial activity against a selected <i>C. perfringens</i> pathogenic strain.....	72
Figure 2. Bacteriocin crude extract enzyme susceptibility assay..	73
Figure 3. Bacteriocin crude extract heat stability assay.....	73
Figure 4. Bacteriocin crude extract pH stability assay.....	74
Figure 5. Molecular weight estimation assay. ....	74

## Liste des sigles et abréviations

5-FC	5-fluorocytosine
5-FU	5-fluorouracile
ABI	Applied Biosystems
AH	Acide hyaluronique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALT	Acide lipotéichoïque
antiSMASH	Antibiotics and secondary metabolite analysis shell
ARNm	ARN messenger
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BAGEL	Bacteriocins genome mining tool
BEC	Binary enterotoxin of <i>Clostridium perfringens</i>
BHI	Brain Heart Infusion broth
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CL	Cardiolipine
CMM	Cooked-meat medium
CO	Monoxyde de carbone
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPA	<i>Clostridium perfringens</i> alpha toxin
CPB	<i>Clostridium perfringens</i> bêta toxin
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
CROPs	Séquences d'oligopeptides répétitifs combinés
ddNTPs	Didésoxynucléotides
DNase	Désoxyribonucléase
EN	Entérite nécrotique (necrotic enteritis)
ETX	Toxine epsilon
H <sub>2</sub>	Dihydrogène
HCl	Acide chlorhydrique

HPLC	High performance liquid chromatography
HSV-1	Herpes Simplex Virus Type 1
HSV-2	Herpes Simplex Virus Type 2
ITX	Toxine iota
kDa	Kilodalton
LD <sub>50</sub>	Dose nécessaire pour tuer 50% d'une population de souris
LPS	Lipopolysaccharides
Man-PTS	Mannose-phosphotransférase
NamH, NamI et NamJ	Sialidases de <i>Clostridium perfringens</i>
NaOH	Hydroxide de sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NetB	Toxine B de l'entérite nécrotique
NetE	Toxine E de l'entérite nécrotique
NetF	Toxine F de l'entérite nécrotique
NetG	Toxine G de l'entérite nécrotique
NeuBI	Neural bacteriocin identifier
ONT	Séquençage par nanopore d'Oxford
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PE	Phosphatidyléthanolamine
PFO	Perfringolysine O
PG	Phosphatidylglycérol
PMN	Cellules polymorphonucléaires
PPi	Pyrophosphate inorganique
PRISM	Prediction Informatics for Secondary Metabolomes
QS	Quorum sensing
SAM	Protéine radicale S-adénosylméthionine
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFP	Shahidi-Ferguson-perfringens agar
SMRT	Séquençage en temps réel à une molécule

SOLiD	Supported Oligonucleotide Ligation and Detection
SPL	Séquençage par ligation
SPS	Séquençage par synthèse
TSC	Tryptose Sulfite Cycloserine agar
UDP-Glc	Uridine diphosphate glucose
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate <i>N</i> -acétylglucosamine
ZWG	Zero-mode waveguides

*À mon père, Martin, pour son grand intérêt envers mes projets, son écoute et ses conseils mais surtout, sa fierté et sa confiance en moi qui m'ont permis d'affronter mes craintes et de me surpasser*

*À ma mère, Chantal, pour son support et son aide disponible à tout moment, son temps et son amour apaisant qui m'ont permis de m'ouvrir et de gérer mon plus grand défaut*

*À mon petit frère, Anthony, pour les moments à rire et à s'agacer sans retenue, son support et son aide toujours présente qui m'ont fait réaliser à quel point ma famille est importante à mes yeux*

*À mes amis d'enfance, Marie-Soleil Boucher, Marybelle Boucher, Cynthia Bédard et Alexandre Morin-Lacombe, pour chaque fou rire et souvenir inoubliable ainsi que leur grande écoute et support qui m'ont permis de décrocher du travail*

*À vous tous, sans qui tout ce travail m'aurait semblé insurmontable...*

## Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Martine Boulianne, ainsi que mon codirecteur, Frédéric Raymond, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet. J'ai eu la chance d'avoir des mentors d'exception qui m'ont permis de prendre confiance en moi tout en agrandissant mon bagage de connaissances. Je tiens à souligner plus particulièrement l'écoute et la confiance du Dre. Boulianne qui m'a grandement aidé au cours des deux dernières années.

J'aimerais également remercier tout le personnel de la Chaire en recherche avicole avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler et développer des liens d'amitié.

J'aimerais remercier tous les organismes subventionnaires dont la Chaire en recherche avicole et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour avoir rendu possible ce projet de recherche.

En terminant, j'aimerais remercier ma famille et mes amis pour leur support.

# Introduction

Depuis plusieurs années, une augmentation de la résistance aux antibiotiques est observée à l'échelle mondiale. Cette augmentation est principalement reliée aux pressions sociétales, à une utilisation inappropriée des antibiotiques, aux diagnostics inadéquats et à l'utilisation dans les hôpitaux et en agriculture [1]. Ainsi, l'industrie canadienne de la volaille a opté pour le retrait des antibiotiques à titre préventif considérés d'importance humaine d'ici 2020 [2]. Certains de ces antibiotiques sont d'importants outils dans le contrôle de l'entérite nécrotique (EN), une maladie qui cause des millions de dollars en pertes économiques mondialement à l'industrie de la volaille. Il est donc essentiel de développer de nouvelles alternatives afin de contrôler l'entérite nécrotique. Plusieurs alternatives ont déjà été proposées pour remplacer les antibiotiques telles que l'utilisation de bactériophages, d'huiles essentielles ou d'acides organiques [3-6]. Chacune d'entre elles possédant ses avantages et inconvénients, aucune n'est complètement efficace.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par une bactérie afin de tuer ou d'inhiber la croissance d'autres microorganismes. Ces peptides antimicrobiens possèdent un spectre d'action étroit, en affectant des bactéries apparentées, ou un large spectre d'action, en affectant un vaste éventail de bactéries [7]. Les bactériocines sont classifiées en trois différentes classes divisées en sous-classes. La classe I contient les bactériocines de faible poids moléculaire qui sont modifiées de façon post-traductionnelle. Les bactériocines de ce groupe possèdent donc des acides aminés inusuels tels que la lanthionine, la  $\beta$ -methylanthionine et autres acides aminés déshydratés [8]. La classe I est sous-divisée en les classes Ia (lantibiotiques), classe Ib (labyrinthopepsines) et classe IC (sanctibiotiques). La classe II est composée de petites bactériocines non-modifiées résistantes à la chaleur. Cette classe est sous-divisée en les classes IIa (bactériocines « pediocin-like »), IIb (bactériocines composées de deux peptides), IIc (bactériocines circulaires) et IId (bactériocines linéaires, non modifiées et non « pediocin-like »). La classe III contient les bactériocines de haut poids moléculaire sensibles à la chaleur [9].

La perfrine est la seule bactériocine reportée et bien caractérisée associée aux souches pathogènes de *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), l'agent causal de l'EN [10]. Les

bactériocines représentent une alternative intéressante aux antibiotiques et c'est pourquoi il est nécessaire d'obtenir davantage d'information sur les bactériocines de *C. perfringens* afin de contrôler l'EN. En effet, il est d'important d'acquérir des informations sur la sensibilité aux protéases et à la chaleur ainsi qu'à la stabilité des bactériocines à divers intervalles de pH afin de développer un produit conférant une protection efficace contre l'entérite nécrotique.

Sachant qu'environ 99 % des bactéries produisent au moins une bactériocine [11], nous avons émis l'hypothèse suivante : *C. perfringens* est capable de produire une ou plusieurs bactériocines différentes de la perfrine qui étaient inconnues jusqu'à présent. Afin de répondre à cette hypothèse, divers objectifs ont été fixés. Le premier d'objectif consistait à identifier des souches commensales de *C. perfringens* ayant une activité antimicrobienne contre des souches pathogènes de *C. perfringens*. Le second objectif était d'isoler et de caractériser les bactériocines produites par une des souches commensales sélectionnées dans l'objectif 1. Finalement, le dernier objectif était de séquencer le génome de cette souche commensale et d'utiliser différents outils bio-informatiques afin de prédire les gènes participant à l'opéron des bactériocines observées au cours du second objectif. Afin d'identifier de nouvelles bactériocines, il était important de sélectionner les souches commensales de *C. perfringens* ne possédant pas le gène de la perfrine.

# Recension des écrits

## 1. *Clostridium perfringens*

### 1.1 Description du microorganisme

*Clostridium perfringens* est une bactérie appartenant au genre *Clostridium*. Ce dernier regroupe des bacilles à Gram positif dont la majorité est anaérobie stricte et sporulée. Cependant, certaines espèces peuvent être aérotolérantes ou même aérobies [12]. Les espèces de *Clostridium* sont capables de former des endospores dont la forme peut varier, soit de ronde à cylindrique. Ce type de spores permet à la bactérie de résister à plusieurs facteurs tels que la chaleur, les désinfectants, la dessiccation ainsi que la radiation [13]. La plupart des clostridies sont mobiles grâce à des flagelles péritriches. De plus, les bactéries du genre *Clostridium* peuvent métaboliser un large éventail de substrats tels que des carbohydrates simples ou complexes, des protéines ou des acides aminés, des lipides, des purines et pyrimidines tout en produisant divers produits comme des alcools, des acides organiques ainsi que de grandes quantités de gaz ( $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ ). Certaines espèces ont aussi la capacité de fixer le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{CO}$  atmosphérique en utilisant la voie de Wood-Ljungdhal [13, 14]. Le genre *Clostridium* comprend environ 180 espèces qui sont ubiquitaires dans l'environnement. Cependant, on les retrouve principalement au niveau du sol et du tractus intestinal des animaux [13, 15].

Pour sa part, *Clostridium perfringens* est une bactérie anaérobie à Gram positif en forme de bâtonnet capable de sporuler. Elle est ubiquitaire dans l'environnement, mais on la retrouve davantage au niveau du sol et dans le tractus intestinal des animaux, notamment celui de la volaille [16]. Ce microorganisme est une cause commune de maladie d'origine alimentaire causant chaque année plus de 170 000 cas répertoriés au Canada et plus d'un million aux États-Unis. La majorité du temps, ces intoxications alimentaires sont associées à la consommation de viande et de volaille contaminées [17, 18]. L'un des facteurs permettant à cette clostridie de causer des maladies alimentaires est la sporulation. Les spores de ce pathogène peuvent persister dans les aliments et ainsi se retrouver dans l'assiette du consommateur. De plus, la sporulation entraîne la production de toxines chez *C. perfringens* participant ainsi à sa pathogénèse. La spore

de ce *Clostridium* permet la survie en conditions défavorables et est composée de plusieurs couches : le manteau, la membrane externe, le cortex, la paroi cellulaire, la membrane interne et le cœur. Le rôle du manteau n'est pas bien défini chez *C. perfringens*, cependant le manteau sert généralement de protection contre les stress oxydatifs, chimiques ou enzymatiques [19]. La membrane externe est nécessaire pour la formation de la spore, mais ne procure aucune protection à celle-ci. Le cortex est fait de peptidoglycane et a un rôle crucial dans la déshydratation du contenu de la spore et aide à la résistance aux stress environnementaux. La paroi cellulaire ne contribue pas à la protection de la spore, mais sert plutôt lors de la germination de cette dernière. La membrane interne se retrouve compressée et permet une faible perméabilité aux molécules pouvant endommager l'ADN dû à la forte concentration en lipides. Finalement, le cœur de la spore contient des enzymes, de l'ARN et l'ADN de la bactérie. Son contenu faible en eau, élevé en acide dipicolinique complexant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et élevé en ADN fait partie d'un aspect de la résistance de la spore. La germination de cette spore s'effectue lorsque les conditions favorables sont présentes [13, 20].

*C. perfringens* peut croître à des températures qui varient entre 15°C à 50°C, cependant l'intervalle de température optimale pour ce microorganisme est de 37°C à 45°C. De plus, ce dernier peut croître à des pH se situant entre 5.5-8.0 [21-23]. Plusieurs milieux sont utilisés pour soutenir la culture de ce microorganisme, notamment le Shahidi-Ferguson-perfringens (SFP) agar, le Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar, le « cooked meat medium » (CMM) et la gélose au sang de mouton (TSA avec sang de mouton). Le milieu SFP est sélectif pour *C. perfringens* et contient de la kanamycine, de la polymyxine B et une émulsion de jaunes d'œufs. Le milieu TSC contient les mêmes ingrédients que le SFP à l'exception de la kanamycine et de la polymyxine B qui sont remplacés par la D-cyclosérine. Sur ces deux milieux, *C. perfringens* apparaît sous forme de colonies noires de 2-4 mm de diamètre. De plus, la présence de l'émulsion de jaunes d'œufs permet de détecter l'activité d'une lécithinase. Le milieu CCM est un bouillon contenant des tissus de cœur de bœuf et soutenant bien la croissance d'organismes saccharolytiques ou protéolytiques. Dans ce milieu, *C. perfringens* produit une turbidité du milieu. La gélose au sang de mouton permet l'identification de *Clostridium perfringens* puisque celui-ci a une apparence particulière sur cette gélose. En effet, les colonies sont translucides, larges et légèrement convexes. De plus, il est possible d'observer une zone de double hémolyse

typique de ce microorganisme (Figure 1). La première zone d'hémolyse est complète (hémolyse bêta) et causée par la toxine thêta alors que la seconde zone d'hémolyse est partielle (hémolyse alpha) et causée par la toxine alpha [24-27].



Figure 1. Culture de *Clostridium perfringens* sur gélose Columbia montrant les deux types d'hémolyse causés par les toxines thêta et alpha. Les hémolyses bêta (zones claires entourant les colonies) et alpha (zones sombres entourant les colonies) sont observées. [Photographie inédite]. © 2019 par N. Deslauriers.

## 1.2 Le toxinotypage

Jusqu'à récemment, *C. perfringens* était classé en cinq toxinotypes différents (A-E) basés sur la production de quatre toxines majeures : alpha, bêta, epsilon et iota ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  et  $\iota$ ). En 2018, Rood *et al.* suggéra d'étendre l'existante classification de *C. perfringens* à sept toxinotypes (A-G) [28]. L'ajout de ces deux derniers toxinotypes est basée sur la production de toxines spécifiquement reliée aux maladies causées par *C. perfringens* [28, 29]. Le toxinotype A est caractérisé par la présence de la toxine alpha; le toxinotype B par la présence des toxines alpha, bêta et epsilon; le toxinotype C par la présence des toxines alpha et bêta; le toxinotype D par la présence des toxines alpha et epsilon; le toxinotype E par la présence des toxines alpha et

iota; le toxinotype F par la présence des toxines alpha et CPE et le toxinotype G par la présence des toxines alpha et NetB. Ces protéines toxiques sont sécrétées par la bactérie lors de la phase exponentielle. La méthode classique de toxinotypage a été développée en 1931 et est basée sur la séroprotection à l'aide d'anticorps neutralisants de surnageants de *C. perfringens* de chaque toxinotype, ainsi que sur la mortalité des souris. Le toxinotype A est retrouvé le plus fréquemment et est responsable d'une panoplie de maladies autant chez l'humain que chez les animaux (gangrène gazeuse). Les toxinotypes B, C, D et E sont plutôt reliés à des maladies affectant les jeunes individus de plusieurs espèces animales [30, 31]. Le toxinotype F est retrouvé dans les cas d'intoxications alimentaires alors que le toxinotype G est retrouvé dans les cas d'entérite nécrotique chez les poulets [28, 29]. Les différents toxinotypes peuvent infecter une variété d'espèces animales. Chez la volaille par exemple, il est présentement connu que les toxinotypes A et C, ce dernier plus rarement, peuvent causer des pathologies [32, 33]. Cependant, ce serait plutôt le toxinotype G qui serait à l'origine de ces pathologies selon la nouvelle classification suggérée plus haut.

## 1.3 Toxines et arsenal enzymatique

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

La toxine alpha de *C. perfringens* est présente chez tous les toxinotypes. Cependant, le toxinotype A en produit en quantités supérieures aux autres. Cette toxine est aussi appelée CPA ou PLC et est codée par le gène *cpa* situé au niveau du chromosome. Celle-ci est une protéine de 43 kDa composée de 370 acides aminés. Elle possède deux domaines : un domaine en N-terminal contenant des hélices alpha étant responsable de l'activité protéique et un second domaine en C-terminal composé de feuillettes bêta antiparallèles responsables de la liaison aux membranes [34]. La toxine alpha est une phospholipase C zinc-dépendante qui dégrade la sphingomyéline et la phosphatidylcholine, composantes importantes des membranes cellulaires, ce qui entraîne la lyse cellulaire. De cette façon, cette protéine toxique cause des dommages considérables tels l'hémolyse des érythrocytes de plusieurs espèces animales (mouton, cheval, lapin, etc.) et de plusieurs autres types de cellules, la perturbation de l'érythropoïèse et l'inhibition de la différenciation des neutrophiles. Aussi, la toxine alpha est la principale toxine impliquée dans la gangrène gazeuse. En effet, l'inactivation du gène de la toxine par insertion

chez des mutants de *C. perfringens* empêche ceux-ci de provoquer la gangrène gazeuse chez la souris, démontrant ainsi l'importance de cette toxine dans la pathogenèse [35]. De plus, il a été rapporté que la toxine CPA cause une contraction de l'iléum et de l'aorte ainsi que la destruction des muscles squelettiques en réduisant le flux sanguin par thrombose chez le rat [36, 37].

### 1.3.2 Toxine bêta ( $\beta$ )

Appelée aussi CPB, la toxine bêta est encodée par le gène *cpb* situé sur des plasmides de virulence dont la taille peut varier. La protéine mature a une taille approximative d'environ 35 kDa et est composée de 336 acides aminés dont 27 correspondent à un peptide signal. Cette protéine est thermolabile et est sensible à la trypsine ainsi qu'à la pepsine. Étant donné qu'elle possède une similarité élevée avec d'autres toxines formatrices de pores connues telles que la toxine alpha de *S. aureus*, elle est considérée comme appartenant à ce groupe de toxines. La toxine bêta est retrouvée chez les toxinotypes B et C de *Clostridium perfringens*. Les souches de *C. perfringens* de type B sont connues pour causer des dysenteries chez l'agneau alors que celles du type C causent des entérocolites nécrosantes. La toxine bêta est dermonécrotique et létale, mais ne possède pas d'activité hémolytique. La protéine toxique attaque le système nerveux autonome et cause la contraction des artères ainsi qu'une augmentation de la pression sanguine. Lorsqu'injectée dans la peau de souris, cette toxine engendre une dermonécrose ainsi que de l'œdème. De plus, il a été démontré que la toxine CPB se lie aux cellules endothéliales intestinales et joue un rôle dans la pathogenèse des souches de *C. perfringens* de type C [35, 36, 38].

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

La toxine epsilon (ETX) est encodée par le gène *etx* situé sur des plasmides de conjugaison. La plupart des souches de *C. perfringens* de type B possède un plasmide en commun dont la taille est d'environ 65 kB et qui encode aussi le gène de la toxine bêta2. Cependant, les souches du type D possède aussi ce plasmide de conjugaison leur permettant de produire les toxines. La protéine toxique epsilon est considérée comme le facteur de virulence majeur chez ces deux toxinotypes. Elle fait partie de la famille des toxines formatrices de pores et est dite « aerolysin-like ». Cette toxine possède trois domaines composés essentiellement de

feuillet bêta [35, 36]. Le premier domaine sert au contact initial avec les cellules; le second, à l'insertion dans la membrane cellulaire ainsi qu'à la formation et la stabilisation du pore; et le dernier, à l'heptamérisation de la protéine. Les cibles majeures de cette toxine sont les intestins, les reins, les poumons et le cerveau. Cependant, la toxine epsilon a aussi été isolée de la colonne vertébrale, les yeux, la rate et le foie. Au niveau intestinal, la toxine cause la nécrose et le détachement des cellules épithéliales entraînant des hémorragies et l'accumulation de fluides. C'est une fois dans la circulation sanguine que la toxine se répand aux autres organes et causent des dommages à ceux-ci [39].

### 1.3.4 Toxine iota (ι)

La toxine iota (ITX) est une toxine binaire de *C. perfringens*. Cette dernière est composée de deux protéines indépendantes, soit Ia et Ib. La toxine est donc encodée par deux gènes retrouvés sur de grands plasmides conjugatifs : *iap* et *iab*. La première protéine, Ia, est la composante qui permet la liaison aux cellules-cibles tandis que la seconde, Ib, est la composante enzymatique. Ces protéines sont synthétisées lorsque le microorganisme est en phase de croissance exponentielle et sont sécrétées sous forme immature. Un clivage de petits peptides en N-terminal par la trypsine ou chymotrypsine permet aux protéines d'être activées. Une fois la protéine Ia internalisée par l'intermédiaire de la protéine Ib, celle-ci ADP-ribosyle l'arginine à la position 177 de l'actine-G. Cette ADP-ribosylation a plusieurs conséquences dont les plus notables sont la dépolymérisation des filaments d'actine ainsi que l'accumulation de monomères d'actine-G. Un changement de morphologie, l'inhibition de l'activation et de la migration des leucocytes, l'inhibition de la contraction des muscles lisses et des troubles dans les processus d'entrée et de sorties de la cellule ciblée sont aussi des conséquences de l'action de la toxine. Auparavant, il était rapporté que chacune des protéines ne pouvait causer séparément de pathologies et que c'était la combinaison des deux qui engendrait la forme toxique. Récemment, des études sur la protéine Ib ont démontré que cette dernière provoque la mort chez les lignées cellulaires A431 et A459 et ce, même en absence de la deuxième composante, la protéine Ia. La toxine ITX possède une certaine similarité avec d'autres protéines ayant une activité d'ADP-ribosylation telle que la protéine insecticide de *Bacillus cereus*. La toxine iota est le principal facteur de virulence chez le type E de *Clostridium perfringens*. Ce toxinotype est connu pour causer des maladies entériques chez les animaux domestiques et le bétail [36, 40, 41].

### 1.3.5 Toxine Bêta 2 (CPB2)

La toxine bêta 2 aussi appelée CPB2 a été isolée pour la première fois d'un porcelet mort d'une entérococolite nécrosante et caractérisée en 1997 [42]. Celle-ci est encodée par le gène *cpb2* et peut être portée par tous les toxinotypes de *C. perfringens*, car elle est d'origine plasmidique [43]. La toxine CPB2 a un poids moléculaire de 27,67 kDa et est composée de 265 acides aminés incluant le peptide signal qu'elle comporte. Cette dernière ne possède pas d'homologie avec la toxine bêta ou toute autre toxine bactérienne connue. Ce peptide est synthétisé durant la phase de croissance exponentielle de la bactérie et est régulé par le système de régulation à deux composantes VirS/VirR. Même s'il n'y a apparemment pas d'homologie entre CPB et CPB2, cette dernière se comporterait de façon similaire à la toxine bêta (CPB). Le mécanisme d'action de cette toxine n'est pas encore bien caractérisé. Cependant, Schotte *et al.*, 2004 ont démontré que la toxine bêta 2 a des effets cytotoxiques sur les ovaires de hamster ainsi que sur la lignée cellulaire de cellules embryonnaires intestinales humaines 1407 [44-46].

### 1.3.6 Entérotoxine (CPE)

L'entérotoxine de *Clostridium perfringens* est une protéine composée de 319 acides aminés et est retrouvée chez tous les toxinotypes. Cependant, certaines souches du toxinotype E possèdent une variante de la protéine CPE qui comporte 10 acides aminés supplémentaires. Cette toxine est encodée par le gène *cpe* retrouvé tant sur le chromosome que sur de gros plasmides. Ce gène est exprimé seulement lors de la sporulation de *C. perfringens* [36, 47]. L'entérotoxine possède un domaine en C-terminal servant à la liaison aux récepteurs ainsi qu'un second en N-terminal étant à l'origine de la formation d'un pore et de la cytotoxicité. Des études ont démontré que le clivage d'environ 44 acides aminés en N-terminal de la protéine CPE augmenterait son activité cytotoxique de deux à trois fois. En considérant que la trypsine et la chymotrypsine intestinales clivent entre 25 à 37 acides aminés en N-terminal des protéines, l'action de ces protéases active davantage l'entérotoxine en la rendant plus cytotoxique [47, 48]. Comparativement aux autres toxines et enzymes hydrolytiques de *C. perfringens*, la toxine CPE

est synthétisée et emmagasinée dans la cellule jusqu'à la lyse de cette dernière relâchant au même moment la toxine dans l'environnement. Une fois libérée par la bactérie, l'entérotoxine se lie à des récepteurs spécifiques des cellules de la muqueuse intestinale : claudine-3, claudine-4 ainsi que d'autres membres de la famille des claudines grâce à son domaine C-terminal [49]. Environ six complexes toxine-récepteur sont nécessaires pour l'assemblage d'un baril bêta qui s'insère dans la membrane cellulaire des cellules hôtes pour ainsi former le pore membranaire (CH-1) d'environ 450 kDa. Ce dernier permet le passage de petites molécules de moins de 200 Da dont le calcium entre la lumière intestinale et le cytoplasme. Un grand influx de calcium dans le cytoplasme est alors provoqué induisant l'apoptose chez les cellules cibles. La mort de celles-ci engendre des changements morphologiques qui exposent d'autres claudines situées sur la surface basolatérale des entérocytes, ainsi que des occludines, des protéines jouant un rôle au niveau des jonctions cellulaires. La liaison à ces récepteurs permet la formation d'un second pore membranaire (CH-2) d'environ 600 kDa dont le rôle n'est pas bien décrit pour l'instant [48, 50].

### **1.3.7 Entérotoxine binaire (BEC)**

La toxine BEC a été isolée de deux cas cliniques de gastroentérites causées par des souches de *C. perfringens* ne possédant pas le gène *cpe*. Celle-ci est composée de deux peptides, BECa et BECb, qui sont encodés par les gènes *becAB* localisés sur un plasmide de 54,5 kb. Les peptides BECa et BECb ont des poids moléculaires respectifs d'environ 47 kDa et 80 kDa et leurs séquences possèdent une homologie avec des membres de la famille des toxines binaires ADP-ribosylantes [51]. Même si la synergie des deux peptides apporte une virulence beaucoup plus élevée, ces derniers possèdent aussi une activité biologique lorsqu'observés individuellement. Il a été démontré que BECa possède une activité ADP-ribosylante tandis que BECb cause une accumulation de fluides dans les intestins [52].

### 1.3.8 Toxine thêta ( $\theta$ )

La toxine thêta de *Clostridium perfringens* est aussi connue sous le nom de perfringolysine O (PFO). Cette dernière est composée de 499 acides aminés incluant un peptide signal de 27 acides aminés et son poids moléculaire est de 54 kDa. Cette protéine est encodée par le gène *pfoA* situé sur le chromosome de tous les toxinotypes de *C. perfringens*. Le gène *pfoA* est régulé par le système à deux composantes VirS/VirR, cependant le signal activant ce système est inconnu [36]. La PFO fait partie des toxines formatrices de pores cholestérol-dépendantes. La toxine thêta est divisée en quatre domaines (D1-D4) étant majoritairement composés de feuilletts bêta. Le domaine 4 (D4) en C-terminal permet l'adhésion au cholestérol des membranes plasmiques des cellules eucaryotes. Cette adhésion engendre un changement de conformation du domaine D3 et induit la formation du pré-pore, un large anneau composé d'environ 35 à 50 monomères de PFO. Par la suite, il y a un alignement des feuilletts bêta suivi de l'insertion du baril bêta dans la membrane cellulaire formant ainsi le pore [53, 54]. Il a été démontré que la toxine thêta lyse les érythrocytes et leucocytes. De plus, Jones and Portnoy (1994) ont démontré que la perfringolysine O de *C. perfringens* permet l'évasion de la bactérie lorsque celle-ci est phagocytée. Cloner le gène de la toxine dans une souche mutante de *Listeria monocytogenes* avirulente ne pouvant plus échapper à la phagocytose (LLO-) permet de rétablir sa virulence dans la souris [55, 56]. En plus de sa cytotoxicité et de sa capacité à échapper aux cellules phagocytaires, la toxine thêta a la capacité de perturber la chimiotaxie efficace des cellules polymorphonucléaires (PMN) empêchant ainsi ces dernières de se rendre au site d'infection rapidement [57].

### 1.3.9 Toxines de l'entérite nécrotique (NetB)

La toxine NetB de cette clostridie a été découverte récemment dans une souche de *Clostridium perfringens* de toxinotype A isolée d'un poulet à griller affecté par l'entérite nécrotique en Australie [58]. Elle fait partie de la famille des toxines formatrices de pore bêta. Cette protéine de 33,2 kDa possède une séquence de 323 acides aminés incluant son peptide signal de 30 acides aminés. La toxine NetB est encodée par le gène *netB* situé sur plasmide conjugatif d'environ 80 à 90 kb qui peut être perdu lors de la culture successive des souches

[59, 60]. Une étude réalisée par Jackie K. Cheung *et al.*, 2010 rapporte que le gène *netB* est régulé par le système à deux composantes VirS/VirR [61]. Avant la découverte de la toxine NetB, la toxine alpha était la protéine candidate dans la pathogénie de l'entérite nécrotique, une maladie causée par *Clostridium perfringens* affectant la volaille. Cependant, une étude a démontré qu'un mutant d'une souche virulente de *C. perfringens* pour la toxine NetB ne pouvait causer la maladie comparativement à la souche sauvage. Lorsque la souche mutante est complétée avec le gène *netB* fonctionnel, il y a un rétablissement de la virulence. Ceci signifiant que la toxine NetB joue un rôle crucial dans la pathogénie de l'entérite nécrotique [58].

### **1.3.10 Autres toxines de l'entérite nécrotique (NetE, NetF et NetG)**

Trois protéines (NetE, NetF et NetG) ont été découvertes à la suite du séquençage d'une souche de *C. perfringens* isolée d'un cas de gastroentérite hémorragique canine. Celles-ci possèdent une homologie de séquence (79%, 48% et 52% respectivement) avec la toxine formatrice de pores NetB. La toxine NetE a une séquence protéique de 322 acides aminés dont un peptide signal de 30 acides aminés est inclus et possède un poids moléculaire de 32,9 kDa. Les toxines NetF et NetG ont une séquence protéique de 305 et 306 acides aminés dont un peptide signal de 24 acides aminés est inclus, et leur poids moléculaire est de 31,7 kDa. Les gènes *netE*, *netF* et *netG* sont retrouvés sur de gros plasmides et la présence de boîtes VirR dans la région promotrice des gènes *netE* et *netG* indique une possible régulation de ceux-ci par le système VirR/VirS [62]. Il a été observé qu'il existe une association entre la présence de souches possédant les gènes *netE*, *netF* et *netG* et les cas de maladies entériques chez les chiens et les chevaux [63]. Plusieurs expériences de mutations et de conjugaisons ont démontré que la toxine NetF est cytotoxique alors que les toxines NetE et NetG ne le sont pas [62]. Les fonctions des protéines NetE et NetG demeurent encore vagues.

### 1.3.11 Toxine TpeL

La toxine TpeL est retrouvée chez les toxinotypes A, B et C de *C. perfringens*. Elle fait partie de la famille des toxines clostridiales glycosylantes. Parmi les toxines produites chez *Clostridium perfringens*, TpeL est celle possédant le poids moléculaire le plus élevé, soit environ 205 kDa [64]. Tout comme les toxines clostridiales glycosylantes, la toxine TpeL possède un domaine ayant une activité glycosyltransférase, un domaine ayant une activité autocatalytique et un domaine transmembranaire. Cependant, elle ne possède pas de séquences d'oligopeptides répétitifs combinés (CROPs) permettant la liaison aux cellules cibles chez les toxines clostridiales glycosylantes [65]. Cette toxine se lie au récepteur lipoprotéique LRP1. Une étude a démontré l'existence d'un second domaine de liaison CROP-indépendant suggérant l'existence d'un second récepteur [66]. Plusieurs études ont été réalisées afin de mieux comprendre le mode d'action de cette toxine. Une étude *in vitro* effectuée par Nagahama et al. a démontré que TpeL utilise l'UDP-GlcNAc et l'UDP-Glc comme substrat pour glycosyler principalement la famille des protéines Ras [67, 68]. Une fois la toxine liée au récepteur, celle-ci est internalisée et s'insère dans la membrane endosomale. Par la suite, l'inositolhexaphosphate cellulaire active le domaine autocatalytique de la toxine qui s'auto-clive. Ce clivage permet le relâchement du domaine d'activité de la toxine dans le cytosol. Finalement, les protéines Rho et Ras sont glycosylées par la toxine les rendant inactives et induisant ainsi l'inflammation et la mort cellulaire [66-68].

### 1.3.12 Toxine delta ( $\delta$ )

La toxine delta de *C. perfringens* appartient à la famille des toxines formatrices de pores bêta. Celle-ci est l'une des trois hémolysines synthétisées, avec les toxines NetB et CPB de *Clostridium perfringens*, par les souches de toxinotypes B et C. La protéine toxique a une séquence de 290 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 32 kDa [69, 70]. La structure de la toxine comporte trois domaines composés essentiellement de feuillets bêta, ce qui se rapproche fortement de la structure des toxines alpha et NetB. Comparativement à ces dernières, la toxine delta reconnaît les gangliosides comme récepteur, plus particulièrement le ganglioside GM2 [70]. Ce dernier est nécessaire à la cytotoxicité de la protéine et celle-ci

n'engendre la cytotoxicité qu'aux cellules possédant le ganglioside GM2 à leur surface tels les érythrocytes, les cellules neuronales et les cellules hépatiques [69, 71]. Après la liaison au récepteur, les monomères de la protéine delta s'assemblent en oligomères pour former le pore membranaire. La toxine cause l'hémolyse des érythrocytes chez le mouton, la chèvre et le porc, mais les autres espèces animales semblent y être résistantes [72, 73]. De plus, la toxine affecte plusieurs autres cellules eucaryotes telles que les monocytes humains, les macrophages de lapin ainsi que les plaquettes des humains, des lapins et des chèvres. Finalement, une mortalité associée à la toxine delta a aussi été observée chez la souris [72].

### 1.3.13 Toxine kappa ( $\kappa$ )

La toxine kappa de *C. perfringens* fait partie de la famille des collagénases. Sous certaines conditions de pH et de température, celles-ci dégradent le collagène en hydrolysant la région de triple-hélice. Cette dégradation contribue à la perte d'intégrité des tissus de l'hôte infecté [73, 74]. La toxine kappa est encodée par le gène *colA* situé sur le chromosome bactérien. La traduction de ce gène résulte en une protéine extracellulaire immature de 126 kDa qui est éventuellement clivée pour obtenir la forme mature de 116 kDa. Cette toxine est retrouvée chez tous les toxinotypes de *C. perfringens*, cependant on la retrouve davantage chez les toxinotypes A, D et E [35]. Plusieurs études ont démontré que la collagénase kappa de cette clostridie a des effets létaux chez la souris et nécrotiques lorsqu'injectée aux souris et lapins [75].

### 1.3.14 Toxine lambda ( $\lambda$ )

La toxine lambda est retrouvée chez les toxinotypes B, E et chez quelques souches du toxinotype D [73]. Cette toxine est un membre de la famille des métalloprotéases zinc-dépendante « thermolysin-like ». Cette protéine est encodée par le gène *lam* situé sur un large plasmide de 70 kb. Elle est constituée de 553 acides aminés et possède un poids moléculaire d'environ 36 kDa. Des études *in vivo* ont démontré que la toxine lambda dégrade des composants des tissus conjonctifs et de la voie du complément, une défense immunitaire de l'hôte. La toxine dégrade de nombreux types de collagène, la fibronectine, le fibrinogène ainsi

que le composant C3 de la voie du complément. Aussi, l'injection de la toxine dans la peau de souris cause l'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que des œdèmes hémorragiques [73, 76]. De plus, une étude a montré que la toxine lambda joue un rôle dans l'activation de la toxine epsilon. Une incubation de la toxine epsilon immature en présence de la toxine lambda a permis de diminuer la dose létale, nécessaire pour tuer 50% d'une population de souris (LD<sub>50</sub>), de la toxine epsilon de 70 000 à 110 ng/kg de masse corporelle. Une analyse par SDS-PAGE a permis de confirmer que la toxine lambda clive la toxine epsilon immature en sa forme mature [77].

### 1.3.15 Toxine mu ( $\mu$ )

La toxine mu fait partie de la famille des hyaluronidases, une classe d'enzymes dégradant principalement l'acide hyaluronique (AH) [78]. Elle agit en retirant la glucosamine de l'acide hyaluronique, un constituant important des tissus conjonctifs. Cette toxine est encodée par le gène *nagH* situé au niveau chromosomique [31, 79]. C'est une protéine de 182 kDa comprenant un domaine catalytique en N-terminal, des domaines de la famille 32 liant des carbohydrates, trois domaines FIVAR ainsi qu'un domaine liant le calcium en C-terminal. La toxine mu est impliquée dans l'établissement et la progression de *C. perfringens* lors de la gangrène gazeuse [79]. La toxine possède une séquence « dockerin-like » en C-terminal permettant son assemblage avec d'autres enzymes hydrolytiques de *C. perfringens* en un complexe enzymatique à la surface des cellules cibles. Cet assemblage permet aux enzymes de fonctionner en synergie pour dégrader de façon efficace et rapide leurs cibles telles que la muqueuse de l'intestin humain et les sucres associés à la matrice extracellulaire d'autres composants présents sur la surface des cellules [80].

### 1.3.16 Toxine nu ( $\nu$ )

La toxine nu est une désoxyribonucléase (DNAse) produite par tous les toxinotypes de *C. perfringens* [73, 81]. Peu d'informations sont retrouvées au sujet de cette toxine, cependant Robb-Smith, (1945) a démontré que l'injection de cette toxine aux lapins résultait en la

destruction du noyau de cellules polymorphonucléées ainsi que celui de cellules musculaires [82].

### 1.3.17 Neuraminidases

*Clostridium perfringens* possède trois sialidases différentes nommées NanH, NanI et NanJ. Les sialidases font partie de la famille des neuraminidases et clivent l'acide sialique de sucres complexes présents sur les glycoprotéines et les glycolipides [83, 84]. Ces protéines ont un poids moléculaire respectif de 43, 77 et 129 kDa et sont encodées par les gènes *nanH*, *nanI* et *nanJ* situés à différents endroits sur le chromosome. Ces gènes sont régulés par plusieurs molécules. Parmi celles-ci, on retrouve le système de régulation à deux composantes VirS/VirR, le senseur kinase ReeS [85], le régulateur transcriptionnel RevR [86] et le régulateur CodY [87]. Comparativement aux deux autres, NanH ne possède aucun peptide signal permettant sa sécrétion et celle-ci est donc retrouvée au niveau du cytosol alors que les autres sont sécrétées. Ces sialidases possèdent un domaine catalytique dont les séquences d'acides aminés sont conservées. En plus de leur domaine catalytique, NanI et NanJ possèdent des domaines supplémentaires pouvant lier des sucres. La plupart des souches sont capables de produire les sialidases, cependant certaines souches ne peuvent en produire qu'une ou deux [73]. Les neuraminidases de *C. perfringens* ont des préférences différentes pour les divers substrats disponibles et c'est donc la combinaison des trois qui assure la libération efficace d'acide sialique. Chiarezza *et al.* (2009) a démontré à l'aide d'une souche mutante que les sialidases de *C. perfringens* ne sont pas essentielles pour la virulence de la bactérie [88]. Cependant, une étude *in vitro* a démontré que ces sialidases contribuent à l'adhérence de *C. perfringens* aux cellules intestinales [89, 90].

Tableau 1. Résumé des toxines et de l'arsenal enzymatique de *Clostridium perfringens*.

<b>Toxines et arsenal enzymatique</b>	<b>Mode d'action</b>
<b>Alpha (<math>\alpha</math>)</b>	Dégrade des composantes de la membrane cellulaire (lyse cellulaire)
<b>Bêta (<math>\beta</math>)</b>	Affecte le système nerveux et cause une vasoconstriction ainsi qu'une hausse de la pression sanguine
<b>Epsilon (<math>\epsilon</math>)</b>	Cause la nécrose de cellules épithéliales et produit ainsi des hémorragies et une accumulation de fluides
<b>Iota (<math>\iota</math>)</b>	Cause une dermonécrose et est cytotoxique
<b>Bêta 2 (CPB2)</b>	Méconnu
<b>Entérotoxine (CPE)</b>	Forme des pores membranaires provoquant la lyse cellulaire
<b>Entérotoxine binaire (BEC)</b>	Provoque l'accumulation de fluides au niveau intestinal
<b>Thêta (<math>\theta</math>)</b>	Forme un pore membranaire provoquant la lyse cellulaire
<b>Entérite nécrotique B (NetB)</b>	Forme un pore membranaire provoquant la lyse cellulaire
<b>Entérite nécrotique (NetE, NetF, NetG)</b>	Méconnu
<b>TpeL</b>	Inactive les protéines Ras et Rho menant à la mort cellulaire
<b>Delta (<math>\delta</math>)</b>	Forme un pore membranaire provoquant la lyse cellulaire
<b>Kappa (<math>\kappa</math>)</b>	Dégrade le collagène et cause une perte d'intégrité des tissus
<b>Lambda (<math>\lambda</math>)</b>	Dégrade des composantes du tissu conjonctif
<b>Mu (<math>\mu</math>)</b>	Dégrade des composantes du tissu conjonctif
<b>Nu (<math>\nu</math>)</b>	Dégrade les acides nucléiques
<b>Neuraminidase (NanH, NanI et NanJ)</b>	Dégrade les glycoprotéines et glycolipides

## **1.4 Pathologies associées à *Clostridium perfringens***

Comme décrit précédemment, *C. perfringens* est une bactérie ubiquitaire de l'environnement et possède un large arsenal toxique. Ce microorganisme a été isolé d'une vaste gamme d'hôtes tels que l'humain, la volaille, le mouton, le chien ainsi que plusieurs autres et est reconnu pour causer diverses pathologies telles la gangrène gazeuse, l'entérite nécrotique et des toxi-infections alimentaires [91, 92].

### **1.4.1 Chez l'humain**

#### **1.4.1.1 Gangrène gazeuse**

La gangrène gazeuse, aussi nommée myonécrose clostridienne, est une maladie caractérisée par la destruction locale des muscles, l'extension aux autres tissus vivants, un choc et éventuellement la mort si aucun traitement n'est entrepris [93, 94]. Celle-ci était rencontrée fréquemment lors de la Première et la Seconde Guerre mondiale alors que les soldats subissaient de graves blessures. Par exemple, lors de la bataille de l'Afrique du Nord, 50% des personnes atteintes de la gangrène gazeuse en sont décédées [95]. Pour causer la pathologie, *C. perfringens* doit d'abord être introduit dans les tissus profonds de l'hôte par l'entremise d'une blessure. L'atmosphère presque anaérobie ainsi que le pH du milieu permettent alors à la bactérie d'y croître. Afin d'obtenir une atmosphère anaérobie, le microorganisme engendre une dysfonction vasculaire. La toxine alpha ainsi que la perfringolysine O sont les principaux facteurs de virulence facilitant la pathogenèse de la gangrène gazeuse. L'injection de ces toxines à du sang humain cause rapidement la formation d'agrégats de plaquettes et de neutrophiles bloquant le flux sanguin et empêchant ainsi un apport en oxygène. La réaction inflammatoire est connue pour aider à combattre les infections, cependant cette réponse immunitaire est neutralisée par les toxines de *C. perfringens* [93, 96].

#### **1.4.1.2 Toxi-infections alimentaires**

*Clostridium perfringens* est aussi à l'origine de deux types de toxi-infections alimentaires : la diarrhée causée par les souches du toxinotype A et dans de plus rares cas,

l'entérite nécrotique causée par les souches du toxinotype C. La majorité des cas de toxi-infections alimentaires à *C. perfringens* proviennent de restaurants, d'hôpitaux ainsi que de résidences de personnes âgées [97]. La toxi-infection alimentaire du toxinotype A est classée au deuxième rang des maladies alimentaires les plus communes dans les pays développés. Aux États-Unis, environ un million de cas sont rapportés chaque année, causant ainsi plus de 380 millions de dollars en pertes économiques [18, 59]. Le facteur de virulence responsable de la toxi-infection est l'entérotoxine CPE de la clostridie. Une étude a démontré que l'inactivation de cette toxine chez des souches causant des toxi-infections alimentaires chez l'hôte rendait celle-ci avirulente [98]. De plus, l'entérotoxine étant synthétisée lors de la sporulation, l'inactivation du gène *spo0A* régulant la sporulation supprime la production de l'entérotoxine et empêche ainsi l'infection par le microorganisme [99]. Cette dernière survient lorsque la nourriture n'est pas cuite adéquatement permettant aux spores de *C. perfringens* de survivre et de germer en cellules végétatives. Celles-ci sont ingérées en grand nombre et les cellules ayant résisté à l'acide de l'estomac transitent vers l'intestin où la sporulation s'active. Simultanément, la toxine CPE est activée et relâchée dans la lumière intestinale lors de la lyse de la cellule-mère. Une fois libérée, la toxine cause des dommages aux tissus de l'iléon entraînant un important efflux de fluides et d'électrolytes dans la lumière intestinale et produisant la diarrhée [100].

La toxi-infection alimentaire par *C. perfringens* du toxinotype C est appelée entérite nécrotique (« pigbel » ou « enteritis necroticans ») et est peu rencontrée de nos jours chez l'humain. Après une incubation de 5 à 6 heures, l'apparition de plusieurs symptômes tels que la diarrhée hémorragique, les douleurs abdominales, les vomissements et l'inflammation de l'intestin grêle surviennent. Les toxines bêta, delta et thêta sont à l'origine de la maladie qui, même en présence de soins, cause entre 15% à 25% de mortalité. Ce type d'intoxication est reliée à un manque d'enzymes protéolytiques au niveau des intestins, ce qui dégrade habituellement les toxines de la bactérie. Cependant, on retrouve aussi ce type d'infection chez les patients diabétiques [97, 101].

## 1.4.2 Poulet

### 1.4.2.1 Entérite nécrotique

Selon la nouvelle classification suggérée par Rood *et al.* (2018), l'entérite nécrotique est une maladie causée par le toxinotype G de *Clostridium perfringens*. L'entérite nécrotique est l'une des maladies intestinales les plus importantes chez la volaille aux États-Unis. En 2015, les pertes économiques reliées à l'entérite nécrotique augmentaient de 2 à 6 milliards de dollars américains [102]. Cette maladie affecte habituellement les poulets âgés de 3 à 4 semaines et peut causer entre 10% et 40% de mortalité dans un élevage [103]. Plusieurs facteurs de virulence participent à la pathogenèse de l'entérite nécrotique, en particulier la présence d'une souche de *C. perfringens* portant la toxine NetB. Dans un premier temps, la bactérie colonise et dégrade le mucus intestinal à l'aide de son arsenal enzymatique. Par la suite, lorsque la population atteint un certain seuil, plusieurs gènes de virulence, dont la toxine NetB, sont exprimés. Une fois le mucus supprimé, la toxine NetB peut accéder aux entérocytes et engendrer la lyse de ceux-ci provoquant une destruction de la muqueuse intestinale. Finalement, la bactérie forme un biofilm adhérent et colonise les tissus profonds de l'intestin [104]. La pathogénie de la maladie est donc reliée à la production de la toxine NetB. Cependant, certaines étapes ne sont pas bien documentées alors qu'elles jouent un rôle important dans le développement de la maladie. Par exemple, la présence du gène *cna* codant pour une adhésine est nécessaire pour que le microorganisme puisse adhérer aux entérocytes [105]. Les signes cliniques associés à l'entérite nécrotique sont : la dépression et l'apathie de l'oiseau présentant un plumage ébouriffé, la perte d'appétit, l'anorexie ainsi que la diarrhée. De plus, la présence d'une litière humide souligne l'entérite [106].

Il existe plusieurs facteurs prédisposant à l'entérite nécrotique chez la volaille. Ceux-ci contribuent à l'altération de l'environnement sain intra-intestinal du poulet. On retrouve parmi ces facteurs le stress, la présence de pathologies telles que la maladie de Gumboro et la coccidiose, la diète du poulet, la densité d'élevage ou encore une altération dans la production du mucus intestinal et du temps de transit intestinal [103, 104, 107]. Afin de prévenir et contrôler les cas d'entérite nécrotique chez la volaille, l'utilisation d'antibiotiques tels que l'avilamycine et la bacitracine dans la nourriture a été largement répandue [108-110]. Avec l'augmentation de

l'antibiorésistance, différents moyens ont été mis en place au Canada afin de diminuer l'ampleur du problème. En décembre 2018, l'appellation « facteurs de croissance » des antibiotiques a été retirée [111]. Ainsi, les éleveurs canadiens ne peuvent plus administrer d'antibiotiques à titre de promoteur de croissance. De plus, les Producteurs de poulets canadiens ont opté pour le retrait des antibiotiques utilisés à titre préventif chez le poulet. L'administration d'antibiotiques de catégorie I et II à titre préventif a été interdite en mai 2014 et janvier 2019 respectivement. D'ici la fin 2020, les Producteurs de poulets canadiens désirent aussi retirer l'utilisation de la catégorie III des antibiotiques à titre préventif pour ne permettre d'utiliser que la catégorie IV correspondant aux antibiotiques qui n'ont aucune importance en médecine humaine [2]. Il existe donc un besoin critique de développer de nouvelles alternatives pour contrôler l'entérite nécrotique à la suite du retrait des antibiotiques.

Plusieurs stratégies pour prévenir la maladie telles que l'utilisation de probiotiques et de prébiotiques, l'addition de bactériocines à la nourriture ou encore l'utilisation de bactériophages sont présentement étudiées. Cependant, chacune des méthodes possède ses avantages et inconvénients et aucune n'est entièrement efficace, contrairement aux antibiotiques [112].

## **2. Bactériocines**

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes d'une bactérie afin de compétitionner contre d'autres bactéries de la même espèce ou d'une espèce différente [113, 114]. Les bactériocines permettent aux bactéries d'éliminer leurs compétiteurs microbiens, mais elles ont aussi une fonction de communication. Les bactéries peuvent donc communiquer entre elles par quorum sensing (QS) ou communiquer avec les cellules de leur hôte [115]. Le QS est un type de signalisation cellulaire dépendant de la densité cellulaire qui déclenche différents changements chez les bactéries lorsque la population atteint un seuil critique [116]. Les bactériocines peuvent être modifiées, ou non, de façon post-traductionnelle et sont regroupées en plusieurs classes [117]. Plus de 99% des bactéries ont la capacité de produire au moins une bactériocine dont la plupart demeurent inconnues. Les bactériocines sont donc retrouvées autant chez les bactéries à Gram positif que chez celles à Gram négatif [11]. Il existe une variété de bactériocines telles que les lantibiotiques, les microcines ou encore les

tailocines par exemple [118-120]. Ces peptides sont généralement de faible poids moléculaire (5-10 kDa) et chargés positivement, toutefois certains ont un poids moléculaire supérieur à 30 kDa ou sont chargés négativement [117, 121].

## 2.1 Classification

Au fil du temps, plusieurs classifications des bactériocines ont été suggérées par Heng *et al* [122], Arnison *et al* [123], Alvarez-Sieiro *et al* [124], ou encore Mokoena [121]. Les bactériocines étaient précédemment regroupées en quatre classes. Cependant, la quatrième classe comprenant les bactériocines de complexes lipidiques ou de carbohydrates a été retirée de cette classification et a été nommée bactériolysine. Depuis, elles sont regroupées en trois classes, elles-mêmes divisées en sous-classes.

### 2.1.1 Classe I

Les bactériocines appartenant à cette classe sont généralement de faible poids moléculaire (19-50 acides aminés) résistantes à la chaleur ou non et comprennent des modifications post-traductionnelles entraînant la production d'acides aminés inusuels tels que la lanthionine, la  $\beta$ -methyllanthionine et autres acides aminés déshydratés [8]. Cette classe est sous-divisée en trois sous-classes : les lantibiotiques (Ia), les labyrinthopepsines (Ib) et les sactibiotiques (Ic) [9, 121]. Parmi cette classe, on retrouve une bactériocine très connue et étudiée, la nisine de *Lactococcus lactis* [11, 125, 126].

### 2.1.2 Classe II

Cette classe regroupe les bactériocines de faible poids moléculaire, non-modifiées et résistantes à la chaleur. La classe est II est sous-divisée en quatre sous-classes : les bactériocines dites « pediocin-like » (IIa), les bactériocines constituées de deux peptides (IIb), les bactériocines circulaires (IIc) et les bactériocines non-modifiées, linéaires et non « pediocin-like » (IId) [127]. La pédiocine PA-1, les lactococcines et les plantaricines sont des membres de la classe II [128].

### **2.1.3 Classe III**

Les bactériocines de cette classe sont de haut poids moléculaire (> 30 kDa) et sensibles à la chaleur. Peu d'informations sur cette classe sont disponibles. Toutefois, il existe plusieurs bactériocines regroupées dans cette classe telles que la colicine, les helveticines et l'entérolysine A [9, 128].

## **2.2 Mode d'action**

Il existe différents modes d'action ainsi que différentes cibles cellulaires employées par les bactériocines d'une bactérie afin de repousser ou éliminer ses compétitrices. La membrane cellulaire des bactéries constitue la cible principale des bactériocines. Celle-ci est composée de phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), lipopolysaccharides (LPS), acide lipotéichoïque (ALT) et de cardiolipine (CL) qui lui confèrent une charge négative. Les bactériocines cationiques sont donc naturellement attirées vers la membrane cellulaire bactérienne, puis les portions hydrophobes du peptide antimicrobien traversent la bicouche lipidique de la membrane. Les peptides s'associent alors en complexes formant des pores membranaires. La perméabilisation de la membrane crée un efflux d'ions et de métabolites qui provoque la dissipation de la force proton-motrice empêchant ainsi la génération d'ATP intracellulaire par la bactérie [9, 114]. Plusieurs molécules telles que lipide II ou le système mannose-phosphotransférase (Man-PTS) servent de points d'ancrage pour les bactériocines facilitant ainsi la formation de pores membranaires. Certaines bactériocines ciblent et fixent simplement le lipide II, un précurseur du peptidoglycane, afin d'inhiber la synthèse de la paroi cellulaire [129, 130]. D'autres bactériocines ciblent l'ADN gyrase et inhibent ainsi la répllication de l'ADN alors que d'autres ciblent l'ARN polymérase [131]. Finalement, certaines bactériocines ciblent une sous-unité du ribosome empêchant ainsi la synthèse protéique [130, 132].

## **2.3 Mécanisme d'auto-immunité**

Une fois relâchées dans l'environnement, les bactériocines peuvent également cibler les bactéries qui les ont produites. Afin de se protéger contre leur propre protéine toxique, les bactéries ont développé des mécanismes d'auto-immunité. Ces dernières produisent des

protéines d'immunité encodées dans le même opéron biosynthétique que la bactériocine. Ces protéines d'immunité sont donc synthétisées au même moment que la bactériocine. Dans le cas des bactériocines ciblant la Man-PTS, les protéines d'immunité sont situées sur la membrane et neutralisent la bactériocine en s'y liant, empêchant ainsi la formation de pores membranaires [133]. D'autres protéines d'immunité sont des protéases transmembranaires appartenant à la famille Abi permettant de dégrader les bactériocines. Ces protéines contiennent trois motifs conservés reconnus pour conférer une activité protéolytique [134]. De plus, la mutagenèse des motifs semble abolir leur fonction d'immunité [135]. Il a été remarqué que ces peptides ont la capacité de cliver différentes bactériocines et peuvent ainsi conférer l'immunité contre d'autres types de bactériocines que celle initialement produite [136]. Aussi, certaines bactéries possèdent des transporteurs ABC qui permettent de pomper les bactériocines à l'extérieur de la bactérie, lui permettant ainsi de survivre. Chez certaines espèces d'Archées, la protéine d'immunité fait partie du précurseur de bactériocine qui est clivé produisant ainsi la bactériocine mature ainsi que la protéine d'immunité active [137].

## 2.4 Biosynthèse

Plusieurs mécanismes de biosynthèses sont décrits dans la littérature et ceux-ci diffèrent selon la classification des bactériocines. De façon générale, les bactériocines sont produites à partir d'une pré-bactériocine inactive qui, à la suite de différentes modifications ou non, deviendra mature et sera transportée vers la membrane cellulaire pour être sécrétée dans l'environnement. Dans le cas de la nisine (bactériocine de classe I) par exemple, le gène *nisA* est traduit en la protéine pré-nisine A qui est ensuite convertie en précurseur de nisine grâce aux gènes *nisB* et *nisC*. Le précurseur de nisine est ensuite exporté à l'extérieur de la cellule grâce aux gènes *nisP* et *nisT* et cliver pour former la nisine A mature [121]. Contrairement aux bactériocines de classe I, celles de classe II ne subissent aucune modification post-traductionnelle. Il existe que peu d'information concernant la synthèse des bactériocines de la classe III. Après leur traduction, ces dernières sont directement exportées vers l'extérieur de la cellule et clivées à un site spécifique (Gly-Gly↓) pour obtenir le peptide mature [138].

Les divers éléments génétiques permettant la biosynthèse d'une bactériocine sont généralement regroupés sous forme d'opérons. Ces derniers se situent au niveau du chromosome, des plasmides ou encore des transposons insérés dans le chromosome. Les gènes

structuraux, de modification, de régulation, de transport et d'immunité composent ces opérons biosynthétiques. Les gènes structuraux codent pour une pré-bactériocine qui comporte des peptides signaux aux extrémités permettant sa reconnaissance et une éventuelle sécrétion par les différents transporteurs membranaires. Les gènes de modification encodent des enzymes responsables de modifier la pré-bactériocine immature à la suite de sa traduction. Les gènes de régulation encodent des protéines de réponse à certains facteurs environnementaux. Les gènes de transport encodent des protéines responsables du transport de la bactériocine vers la membrane cellulaire et assurent sa sécrétion dans l'environnement. Finalement, les gènes d'immunité encodent de petites protéines protégeant la bactérie de sa propre bactériocine [139].

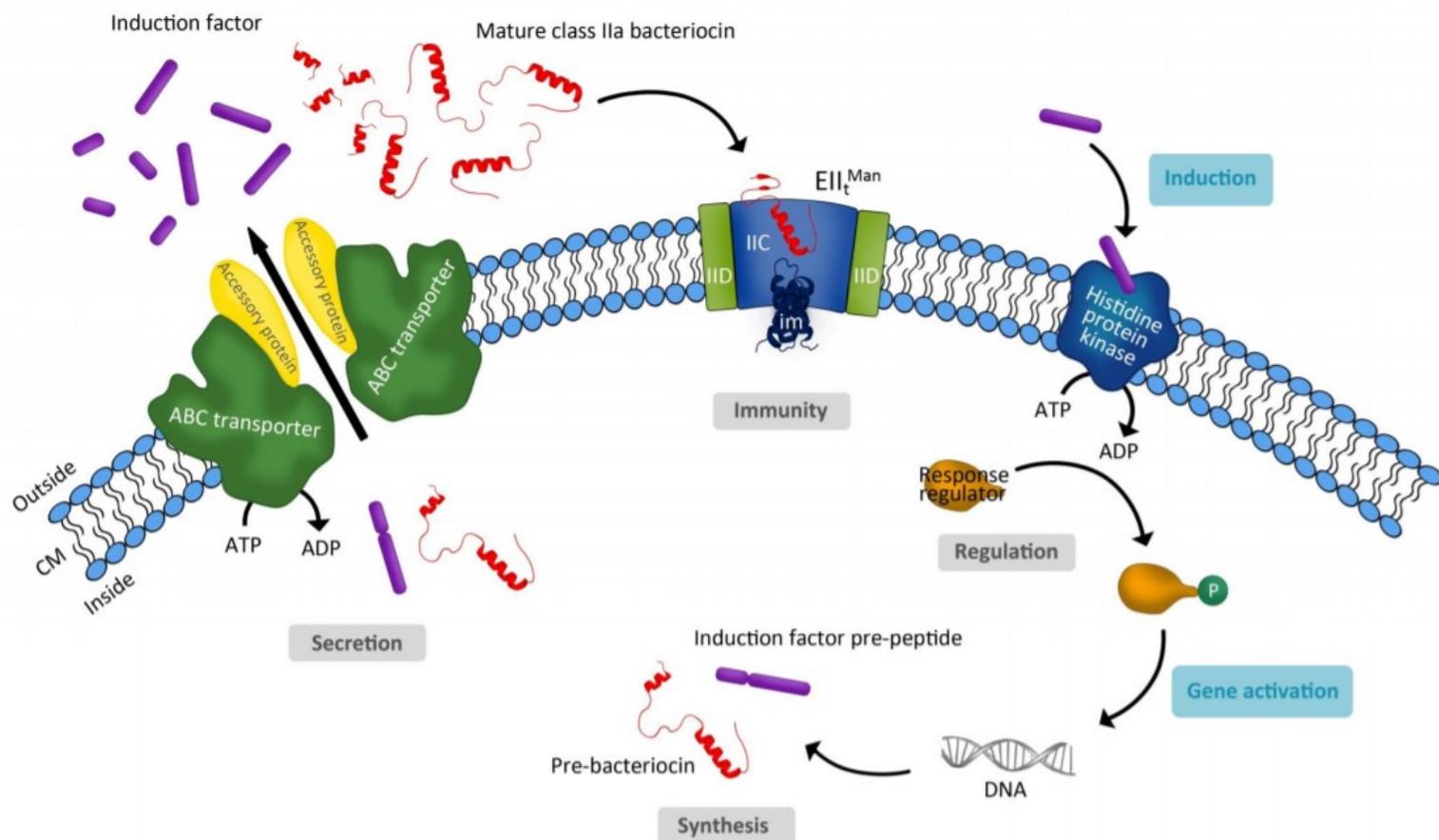


Figure 2. **Biosynthèse des bactériocines de classe IIa.** CM, membrane cellulaire; Im, protéine d'immunité; EII t Man, mannose PTS perméase; IIC et IID, domaines de EII t Man interagissant avec la bactériocine mature. Tiré de «Genetic characterisation and heterologous expression of leucocin C, a class IIa bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. », par X. Wan, avril 2013, *Appl Microbiol Biotechnol.*, fig.3. © X. Wan. Reproduit avec permission.

## 2.5 Régulation de la synthèse

Selon plusieurs études, la régulation de la production des bactériocines est dépendante du quorum sensing (QS). Les bactériocines sont constitutivement synthétisées et sécrétées à un taux basal dans l'environnement, puis lorsque la concentration de celles-ci atteint un certain seuil, leur synthèse en grande concentration est déclenchée. En effet, lorsque le seuil est atteint, les bactériocines interagissent avec une protéine senseur transmembranaire (histidine kinase) qui envoie un signal intracellulaire activant l'opéron de ces dernières. Ce contrôle de la production intensive de bactériocines permet à la bactérie de s'assurer de rapidement dominer ses compétiteurs bactériens afin que ceux-ci ne puissent avoir le temps d'activer des mécanismes de défenses [140]. Dans le cas de la nisine, le gène *nisA* est retrouvé sous forme d'ARNm monocistronique constitutivement transcrit et d'ARNm polycistronique (*nisABTCIP*) transcrit à un taux très faible. Lorsque la concentration de nisine atteint le seuil requis, la transcription de l'ARNm polycistronique est hautement activée menant à la production de nisine en grande quantité. De plus, il a été remarqué qu'une délétion dans le gène structural *nisA* menait à l'abolition complète de la production de nisine, mais aussi de sa transcription. L'incorporation de nisine en concentration sous-inhibitrice dans le milieu a permis de rétablir la transcription du gène suggérant ainsi que la nisine possède une activité de signalisation et une activité antimicrobienne [140-142].

## 2.6 Utilisations

Depuis la découverte de leur activité bactéricide, il existe un intérêt grandissant pour les bactériocines. Cependant, celles-ci possèdent plusieurs autres fonctions différentes qui sont tout aussi attirantes. Certaines bactériocines ont une activité bactéricide, antivirale, spermicide et anticancéreuse.

### 2.6.1 Utilisation en tant qu'agent de conservation naturel

Depuis quelques années, les bactériocines sont utilisées dans différents domaines. Tout d'abord, ces dernières sont présentement utilisées dans le domaine alimentaire sous trois formes : la bactériocine purifiée (Nisaplin®, contenant 2,5% de nisine), un extrait brut de fermentation contenant des bactériocines que l'on retrouve dans les produits laitiers ou

fermentés (Micro-GARD®) et des cultures productrices de bactériocines. Le but principal est de contrôler ou inhiber la croissance d'agents pathogènes que l'on pourrait retrouver dans les aliments. Jusqu'à présent, seulement la nisine possède la mention « généralement considérée comme sécuritaire » et est autorisée comme agent de conservation dans les aliments. Depuis, plusieurs recherches sont effectuées dans le but de modifier les bactériocines afin de la rendre plus résistantes aux enzymes protéolytiques ou d'augmenter leur activité antimicrobienne [143-145].

### **2.6.2 Utilisation en tant que probiotiques**

Par définition, les probiotiques sont des microorganismes vivants qui confèrent des bénéfices à leur hôte, lorsque consommés en quantité adéquate. Les lactobacilles, les streptocoques, les levures ainsi que les bactéries entériques non pathogènes sont les organismes les plus utilisés comme probiotiques [146, 147]. Les probiotiques fonctionnent de différentes façons, soit en renforçant la barrière intestinale, en modulant le système immunitaire ou encore en produisant des composés antimicrobiens tels que les bactériocines [148]. Une grande partie des publications ont été réalisées sur l'efficacité des probiotiques *in vitro*, alors que leur efficacité *in vivo* est remise en question. Cependant, il a été démontré que les probiotiques ont la capacité d'empêcher une infection bactérienne dans différents modèles animaux. Par exemple, une étude a mis en évidence une souche de *Lactobacillus salivarius* capable d'empêcher l'infection par le pathogène *Listeria monocytogenes* de souris. De plus, l'utilisation d'une souche mutante déficiente en bactériocines de *L. salivarius* pour protéger les souris ainsi que l'expression de la protéine d'immunité chez *L. monocytogenes* ont permis d'observer une infection bactérienne chez les souris, venant appuyer l'efficacité du probiotique *in vivo* [149]. Une autre étude réalisée chez les bovins a, elle aussi, mis en évidence l'efficacité des probiotiques dans la réduction de la prévalence de la bactérie *Escherichia coli* O157 : H7 [150].

### **2.6.3 Utilisation en tant qu'agents antimicrobiens**

Avec l'augmentation constante de la résistance aux antibiotiques, le besoin de trouver de nouvelles alternatives se fait sentir et les bactériocines pourraient être une solution intéressante à envisager. En effet, les bactériocines possèdent de nombreuses caractéristiques attrayantes telles que leur efficacité à inhiber la croissance de diverses bactéries pathogènes sans

affecter pour autant le reste de la flore intestinale, leur résistance aux températures et pH variables, leur faible toxicité pour l'hôte ou encore leur chance de production *in situ*. Plusieurs études ont démontré l'activité antimicrobienne des bactériocines sur la croissance de bactéries pathogènes. Par exemple, la nisine A permet d'éliminer ou de maintenir à un niveau acceptable plusieurs microorganismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* [151-153].

De plus, les bactériocines ont aussi un effet sur les biofilms bactériens. Ceux-ci sont un obstacle pour le traitement de maladies ou pour le nettoyage en industrie alimentaire. Par définition, un biofilm est un amas de cellules entourées d'une matrice attachée à une surface biotique ou abiotique. Le biofilm confère une résistance chimique, physique et antimicrobienne aux bactéries qui le composent. Il a été démontré que les bactériocines ont la capacité de rendre les biofilms perméables. Notamment, il a été démontré que la nisine et la lacticine Q ont une activité bactéricide contre le biofilm de *S. aureus* résistant à la méticilline comparativement à un antibiotique, la vancomycine, qui n'avait aucun effet [154]. Une seconde étude s'intéressant à la gallidermine de *Staphylococcus gallinarum* a mis en évidence la capacité de la bactériocine à éliminer les cellules de *S. aureus* et *S. epidermidis* et prévenir la formation de leur biofilm. Cependant, l'efficacité de la gallidermine diminuait selon la maturité du biofilm [155].

En plus de leur activité bactéricide, les bactériocines semblent aussi avoir une activité antivirale. Il a été démontré que les bactériocines ST5Ha d'*Enterococcus faecium* et la subtilosine de *Bacillus amyloliquefaciens* ont une activité antivirale contre les virus HSV-1 (Herpes Simplex Virus Type 1) et HSV-2 (Herpes Simplex Virus Type 2) respectivement [156, 157]. Selon différentes observations, les bactériocines inhiberaient la synthèse des protéines virales, la multiplication virale et le relâchement de virions par la cellule hôte [158, 159]. Malgré tout, davantage d'information sur le mécanisme d'action des bactériocines sur les virus est encore nécessaire.

#### **2.6.4 Utilisation en tant qu'agents anticancéreux**

Le cancer est l'une des principales causes de décès mondialement [160]. Plusieurs technologies ont été mises au point afin de prévenir et traiter les cas de cancers telles que la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et plusieurs autres [161]. Cependant, chacune de ces technologies possède des limitations et des effets secondaires indésirables. Plusieurs études

se sont intéressées aux propriétés anticancéreuses des bactériocines. Par exemple, il a été démontré que la nisine induit l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et une réduction de la prolifération cellulaire chez des cellules squameuses de carcinome humain *in vitro* et *in vivo* chez des rats [162]. Les propriétés cationiques et amphipathiques des bactériocines seraient à l'origine de leur capacité à traiter les cellules cancéreuses. Ces dernières sécrètent des anions de lactate qui remplacent les charges positives à la surface de la membrane devenant donc chargée négativement [163]. De plus, les cellules cancéreuses surexpriment la phosphatidylsérine et les mucines O-glycosylées contribuant à augmenter la charge négative de leur membrane [164]. Les bactériocines sont donc naturellement attirées vers la membrane des cellules cancéreuses chargée négativement comparativement aux cellules saines. Le mécanisme selon lequel les bactériocines traitent les cellules cancéreuses est toutefois incertain et davantage d'information à ce sujet est nécessaire.

### **2.6.5 Administration**

Grâce à la technologie d'encapsulation dans des liposomes, les bactériocines sont acheminées plus facilement à leur destination, leur stabilité est améliorée et leur toxicité est diminuée. Les liposomes sont des vésicules artificielles sphériques lipidiques dans lesquelles sont emmagasinées certaines molécules qui sont transportées et livrées à une destination précise [165]. De cette façon, l'utilisation des bactériocines est davantage intéressante quant au remplacement des antibiotiques actuels.

## **2.7 Bactériocines de *Clostridium perfringens***

Avec le retrait des antibiotiques, il est essentiel de développer de nouvelles alternatives pour contrôler les maladies telle que l'entérite nécrotique, une maladie causée par le microorganisme *Clostridium perfringens*. Les bactériocines représentent une alternative de choix aux antibiotiques et c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre leur fonctionnement. Chez *C. perfringens*, il existe très peu d'informations quant aux bactériocines de cette bactérie.

### **2.7.1 SN-a et SN-b**

Les bactériocines SN-a et SN-b ont été isolées d'une souche de *C. perfringens* nommée SN-17. Cette souche est un mutant spontané de la souche SN-2, une souche isolée de l'environnement. La production de ces deux peptides antimicrobiens s'effectue en fin de phase exponentielle. Les poids moléculaires des bactériocines SN-a et SN-b sont de 70 kDa et 100 kDa respectivement. Ces peptides sont thermolabiles et sensibles à la pronase, mais pas aux DNAses et RNAses [166].

### **2.7.2 N5**

Peu de données ont été rapportées sur la bactériocine N5 de *C. perfringens*. Celle-ci possède un poids moléculaire approximatif de 82 kDa, est thermolabile et est inactivée par des enzymes protéolytiques [167]. De plus, il a été observé que la bactériocine N5 inhibe simultanément la synthèse protéique ainsi que la synthèse d'acides nucléiques chez les souches de *C. perfringens* sensibles [168].

### **2.7.3 Bactériocine 28**

La bactériocine 28 est produite par la souche 28 de *C. perfringens*. Le poids moléculaire de ce peptide est estimé à 100 kDa. Selon Li *et al.* (1982), la bactériocine 28 serait une glycoprotéine car celle-ci est souvent isolée en présence de différents sucres. De plus, il a été observé que cette bactériocine est immunogène, induisant la production d'anticorps neutralisants [169].

### **2.7.4 BCN5**

La bactériocine BCN5 est encodée par le gène *bcn* présent sur le plasmide pIP404 isolé d'une souche de *C. perfringens* appelée CPN50. L'expression du gène *bcn* est induite par une exposition des cellules au rayonnement UV ou à la mitomycine C [170]. Cette bactériocine a un poids moléculaire de 96,6 kDa [171].

### 2.7.5 Perfrine

La perfrine est la principale bactériocine de *C. perfringens* rapportée et bien caractérisée qui est associée à des souches pathogènes de cette espèce. Elle a été isolée pour la première fois à partir d'une culture de la souche 56 de *C. perfringens*, une souche isolée d'un poulet de chair présentant des lésions intestinales nécrotiques sévères. Cette bactériocine est encodée par le gène *perfrin* présent sur le chromosome bactérien. La perfrine a un poids moléculaire de 11,5 kDa et ne possède aucune homologie de séquence avec d'autres bactériocines connues. De plus, il a été démontré que la perfrine est thermolabile, inactivée par l'action de la trypsine et de la protéinase K, mais stable à un large intervalle de pH. La perfrine agit en formant un pore membranaire causant ainsi la mort des cellules cibles. Pour l'instant, l'activité bactéricide de cette bactériocine n'a été testée que sur des souches de la bactérie *Clostridium perfringens* [10].

## 3. Séquençage de l'ADN

Depuis la découverte de la structure de l'ADN, plusieurs avancées ont permis de comprendre le fonctionnement et la diversité du génome des organismes vivants. Le séquençage d'ADN est un outil primordial permettant l'analyse de l'ADN qui contient l'information héréditaire de tout organisme vivant. En effet, cet ADN stocke tous les gènes nécessaires à la croissance, au fonctionnement et à la reproduction d'un organisme. C'est pourquoi l'invention du séquençage de l'ADN a été une avancée majeure pour la recherche biologique et a permis d'apprécier la complexité du matériel génétique. Depuis, de multiples technologies possédant chacune ses avantages et inconvénients ont été mises au point (Tableau 2).

### 3.1 Historique

Avant même de séquencer l'ADN d'organismes, les travaux de séquençages portaient plutôt sur les protéines et l'ARN. À l'aide d'une technique de fragmentation, l'insuline est la première protéine à avoir été séquencée par Frederick Sanger dans les années 1950 [172]. Par la suite, en utilisant une technique de fragmentation à l'aide d'ARNases, la première séquence d'ARN, l'ARNt de l'alanine, a été séquencée [173]. L'arrivée de la technique d'empreinte à l'aide de fragments marqués radioactivement a permis de grandement simplifier les techniques de séquençage précédentes. C'est grâce à ce marquage radioactif et à la purification du génome

du bactériophage lambda que les premiers séquençages de l'ADN ont été effectués. En 1977, Sanger développe la technique de « terminaison de chaîne » qui consiste à incorporer des didésoxynucléotides (ddNTPs) marqués radioactivement, des monomères d'ADN ne permettant pas l'extension du brin d'ADN à séquencer. Le tout s'effectuait en quatre réactions parallèles comprenant chacune un seul des quatre ddNTPS, puis le résultat était observé dans quatre puits d'un gel de polyacrylamide. Avec l'autoradiographie, il était possible de visualiser quelle base venait d'être incorporée dans l'ADN et ainsi déterminer la séquence du segment d'ADN [174]. Le séquençage de l'ADN venait de débiter.

## **3.2 Techniques de séquençage**

### **3.2.1 Séquençage de première génération**

Après la mise au point de la technique utilisant la radioactivité, plusieurs avancements en coloration et détection de fluorescence, en enzymologie et en électrophorèse par capillaires ont permis d'améliorer cette précédente technique et de créer la plateforme de séquençage Sanger actuelle. De nos jours, les ddNTPS sont marqués avec un fluorophore de couleur différente pour chacun des nucléotides (adénine, cytosine, thymine et guanine). Lorsqu'un ddNTP est incorporé dans l'ADN, un laser excite le fluorophore de ce dernier et une émission de couleur, qui diffère selon le ddNTP, est capturée par un appareil. Les signaux d'émission bruts captés sont ensuite normalisés et filtrés selon certains critères afin d'optimiser la lecture de la séquence d'ADN. Il est ensuite possible de déterminer la base incorporée à une certaine position dans l'ADN, puis le procédé est effectué de nouveau pour déterminer la base suivante et ainsi obtenir la séquence du brin d'ADN. Un système de cotes (Phred20 ou Q20) est utilisé pour valider la précision de chacune des bases incorporées. Plus le score d'une base à une certaine position est élevé, plus la probabilité d'erreur que cette base soit erronée est faible. Ce type de cotes est utilisé comme standard à travers les diverses technologies de séquençage [175]. Le séquençage Sanger fait partie des technologies de première génération et permet de générer des fragments de faible longueur (moins d'un kilobase). Afin d'analyser de plus grands fragments, le séquençage de type « shotgun » est utilisé [174]. Cette méthode consiste à briser le génome désiré en plusieurs fragments qui sont séquencés à l'aide de machines. Les courtes séquences obtenues sont ensuite assemblées en plus longues séquences (contigs) grâce aux

chevauchements de chacune d'entre elle [176]. C'est d'ailleurs grâce à la méthode « shotgun » que fût séquencé le premier génome humain lors du « Human Genome Project » au début des années 2000 [177].

### **3.2.2 Séquençage de deuxième génération**

Les approches de séquençages de deuxième génération sont divisées en deux groupes : le séquençage par ligation (SPL) et le séquençage par synthèse (SPS). Parmi ces groupes, on retrouve trois principales plateformes de séquençage : Roche 454, Illumina/Solexa et ABI/SOLiD.

#### **3.2.2.1 Roche 454**

La technologie Roche 454 utilise le pyroséquençage, une approche de SPS. Le pyroséquençage consiste à détecter l'émission de lumière créée par une enzyme. En effet, lors de la synthèse de l'ADN, il y a relâchement d'un pyrophosphate inorganique (PPi) lorsqu'une base est ajoutée au brin par la polymérase d'ADN. Ce PPi est ensuite transformé en ATP par une enzyme, l'ATP sulfurylase, permettant à une seconde enzyme, la luciférase, de générer de la lumière en présence de son substrat, la luciférine. Il est donc possible de connaître la séquence d'ADN en incorporant les différents nucléotides à tour de rôle jusqu'à la détection d'un signal lumineux par un appareil. De plus, l'intensité du signal permet de déterminer le nombre de bases ajoutées durant chaque ajout de réactif. Par exemple, l'incorporation de trois adénines produira une intensité lumineuse environ trois fois plus élevée que l'incorporation d'une seule adénine. Il existe deux types de plateformes utilisant cette technologie : en phase solide et en phase liquide. En phase solide, l'ADN est immobilisé et mis en présence des trois enzymes mentionnées précédemment : la polymérase d'ADN, l'ATP sulfurylase et la luciférase. Plusieurs lavages sont effectués afin de retirer la solution de nucléotides venant d'être incorporés à l'ADN et la remplacer par une solution contenant un nucléotide différent. En phase liquide, une quatrième enzyme, l'apyrase, est ajoutée à la réaction. L'apyrase permet de dégrader les nucléotides restants dans le tube de réaction permettant ainsi d'éliminer les étapes de lavages [178-180]. En un essai, le pyroséquençage permet la génération de plusieurs séquences provenant de différents échantillons grâce à un système d'étiquettes ajoutées à l'ADN matrice donnant ainsi une grande profondeur à la technique. De plus, le coût par base séquencée et le

temps requis sont moindres comparativement à la méthode Sanger [179]. Il existe différents inconvénients à l'utilisation de cette technologie. Tout d'abord, il peut être difficile de détecter un polymorphisme dans l'ADN. Aussi, il est difficile à déterminer le nombre exact de bases ajoutées puisque la détection du signal lumineux n'est plus linéaire après l'ajout de plus de 5 bases [178]. Plusieurs modèles de séquençage utilisant cette technologie ont été mis au point, notamment un système en microplaques, un système de microfluidique et un système de micropuces.

### **3.2.2.2 Ion Torrent**

En 2010, la technologie Ion Torrent est créée par la compagnie Life Technologies. Cette technologie consiste à détecter le relâchement d'ions hydrogène lors du séquençage et n'utilise donc pas de nucléotides marqués fluorescents comme c'est le cas du pyroséquençage. Ion Torrent utilise une micropuce contenant plusieurs puits dans lesquels on retrouve une bille possédant divers fragments d'ADN à sa surface. Pour ce faire, l'ADN à séquencer est d'abord divisé en divers fragments auxquels on fixe un adaptateur permettant la liaison de ces derniers aux billes. Ils sont ensuite amplifiés de manière clonale directement sur les billes. Par la suite, l'ADN polymérase et les amorces de séquençages sont ajoutés et fixés aux puits. Les nucléotides sont rajoutés aux puits individuellement par étape. Lorsqu'un nucléotide complémentaire au brin d'ADN matrice est disponible dans l'environnement, la polymérase incorpore celui-ci dans le brin d'ADN en cours de synthèse libérant ainsi un proton pour chaque nucléotide ajouté. Le relâchement d'un proton induit un changement de pH dans l'environnement qui est détecté et convertit en signal électrique par un senseur situé au fond des puits. Finalement, une étape de lavage est effectuée afin de retirer le surplus du premier nucléotide incorporé pour ajouter le second nucléotide. Ainsi, la séquence d'ADN des fragments est déterminée [181]. Cette technologie permet de générer des fragments de 200 pb, 400 pb ou 600 pb avec un débit allant jusqu'à 10 Gb. Ce type de séquençage permet de séquencer des fragments d'ADN plus longs et plus rapidement (entre deux et huit heures) que la technologie Sanger. Cependant, il est difficile d'interpréter des séquences homopolymères avec le séquençage Ion Torrent qui cause des erreurs d'insertion et de délétion d'environ 1% [182].

### 3.2.2.3 Illumina/Solexa

Solexa est une compagnie ayant mis au point une nouvelle stratégie de séquençage par synthèse basée sur la détection de nucléotides fluorescents. En 2007, la compagnie Illumina a acheté Solexa et a développé les séquenceurs Illumina [183]. De nos jours, la technologie Illumina est l'une des plus utilisées. La première étape de cette stratégie consiste à segmenter l'ADN de façon aléatoire, puis des adaptateurs sont liés aux extrémités des fragments générés. Puis, les fragments sont fixés à un support solide. Ce dernier possède des adaptateurs fixés à sa surface qui sont complémentaires à ceux liés aux fragments d'ADN. La seconde étape consiste à amplifier les fragments d'ADN grâce à une stratégie nommée « amplification PCR par ponts » qui crée des regroupements d'environ un million de copies de chacune des séquences. La dernière étape consiste au séquençage des fragments. Pour ce faire, un mélange contenant les nucléotides fluorescents, les amorces de séquençage et la polymérase est ajouté. Une fois les amorces de séquençage hybridées aux fragments d'ADN matrice, la polymérase incorpore les nucléotides modifiés. Chacun des nucléotides possède un marqueur fluorescent propre à lui ainsi qu'un groupement hydroxyle inactif en 3' qui empêche l'incorporation de plus d'un nucléotide à la fois. Les regroupements de fragments d'ADN sont ensuite excités par un faisceau laser, puis l'émission de fluorescence est détectée par un dispositif à charge couplée et un ordinateur qui traduit le signal en une séquence nucléotidique. Le processus continu ainsi afin d'obtenir la séquence complète [182, 184]. Présentement, la compagnie Illumina offre différentes plateformes de séquençage telles que MiSeq, NextSeq 500 et HiSeq 2500 produisant des données de 15 Gb, 120Gb et 1000 Gb par réaction respectivement. Parmi les plateformes disponibles, HiSeq est la plus adéquate pour le séquençage de génomes complexes tels que le génome humain tandis que le NextSeq est conçu pour le séquençage des exomes. Finalement, la plateforme MiSeq est adaptée pour la paillasse des laboratoires et permet le séquençage de plus petits génomes. La technologie Illumina permet de séquencer jusqu'à 1 Tb de séquences par jour d'une longueur maximale de 300 pb. La précision du séquençage est estimée à 99,9% et permet un meilleur séquençage des régions polymériques comparativement aux technologies précédentes. En contrepartie, le pourcentage d'erreurs de substitution est plus élevé et une diminution de l'efficacité des réactions de séquençage est observée après l'étape de clivage du groupement de blocage. De plus, l'étape d'amplification PCR par ponts apporte un biais au

niveau du pourcentage GC des séquences [185]. Cela peut s'expliquer du fait que les régions riches en contenu GC requièrent une température de dénaturation supérieure aux régions riches en AT ou normalement distribuées lors d'une PCR [186].

#### **3.2.2.4 ABI/SOLiD**

Tout comme Solexa et Illumina, la technologie SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection) a été achetée par ABI (Applied Biosystems) en 2007. Cette technologie utilise une approche de séquençage par ligation qui s'effectue en plusieurs cycles. Tout d'abord, l'ADN est divisé en fragments et des adaptateurs y sont fixés aux extrémités. Les fragments sont ensuite fixés à une bille et amplifiés par une réaction de PCR par émulsion. Par la suite, les billes sont fixées à une mince plaque de verre de façon covalente. Une solution contenant les octamères marqués avec fluorescence et une ligase est ajoutée. La ligase incorpore l'octamère correspondant, puis la fluorescence du marqueur est enregistrée. Les résultats sont représentés sous forme d'espaceurs colorés dont quatre couleurs représentent 16 combinaisons possibles de deux bases. Une fois le premier octamère enregistré, le brin synthétisé est enlevé et un nouveau cycle début, cette fois-ci avec une amorce de séquençage hybridée à la position n-1 du brin d'ADN matrice. Le processus est répété de cette façon jusqu'à ce que toutes les bases du brin d'ADN soient séquencées à deux reprises. Les données enregistrées sont ensuite converties en séquences nucléotidiques permettant d'obtenir la séquence du fragment analysé [182]. Cette technologie permet de séquencer des fragments d'une taille entre 25 et 75 nucléotides et de séquencer 300 millions de billes en parallèle. De cette façon, il est possible de séquencer jusqu'à 30 Gb par essai. De plus, la précision de cette méthode est plus élevée que les autres, car chacune des bases est séquencée en double. En contrepartie, plusieurs sources d'erreur peuvent biaiser les résultats. Tout d'abord, les billes étant trop près les unes des autres causent de mauvais résultats de lecture et diminuent la qualité du séquençage. Aussi, une mauvaise hybridation des amorces entraîne une diminution du nombre de fragments participant à l'amplification et au séquençage des fragments. Finalement, un clivage incomplet du colorant à la fin d'un cycle augmente le pourcentage d'erreur au fil des cycles de ligations [187].

### 3.2.3 Séquençage de troisième génération

Il existe deux approches de séquençage de troisième génération : séquençage en temps réel à une molécule (SMRT) et une approche synthétique qui consiste à employer une librairie de fragments générés par la technologie Illumina pour créer de longs fragments. De nos jours, l'approche SMRT est la plus utilisée et regroupe deux technologies : PacBio et ONT.

#### 3.2.3.1 PacBio

La technologie de séquençage de troisième génération la plus utilisée actuellement est PacBio de Pacific Biosciences. Cette compagnie est la première à lancer une technologie de séquençage utilisant l'approche SMRT [182]. PacBio utilise des plaques recouvertes d'une mince couche métallique comportant des milliers de nanopores appelés « zero-mode waveguides » (ZMGs) dont le fond est transparent. Une polymérase d'ADN est fixée au fond de chacun de ces derniers. La technologie PacBio utilise des nucléotides marqués de fluorescence. Le faible volume des ZMGs permet l'entrée d'une seule molécule d'ADN à la fois. Lorsque la polymérase incorpore un nucléotide complémentaire, celui-ci se retrouve assez près de la source d'excitation et émet une fluorescence qui est enregistrée par un appareil. De cette façon, la séquence d'ADN est déterminée [187]. Cette technologie permet de générer de gros fragments allant de 10 kilobases jusqu'à 100 kilobases. Le désavantage de PacBio est que le pourcentage d'erreur des lectures est relativement élevé, soit environ 10% distribué aléatoirement. En revanche, la combinaison de sa tolérance au contenu GC élevé d'un génome, son pourcentage d'erreur réparti aléatoirement, sa génération de longs fragments et sa couverture redondante permet un assemblage *de novo* de grande qualité comparativement aux technologies précédentes [188].

#### 3.2.3.2 Séquençage par nanopore d'Oxford (ONT)

Le concept d'utiliser des nanopores dans une membrane pour séquencer l'ADN est arrivé vers la fin des années 1980. Cependant, plusieurs obstacles ont été rencontrés et les premiers résultats de séquençage par nanopores sont apparus en 2012 seulement [189]. En 2014, ONT lance un premier prototype de séquençage nommé MinION mesurant environ quatre pouces de long et connecté à un ordinateur par un port USB. Contrairement aux autres technologies, cette stratégie consiste à détecter directement la composition d'un brin d'ADN natif. Pour ce faire,

l'ADN traverse un pore protéique, à l'aide d'une protéine moteur, dans lequel un courant électrique est présent. La translocation de l'ADN à travers le pore engendre un blocage du courant électrique. La variation du voltage est caractéristique de la séquence d'ADN analysée. Ainsi, cette variation de courant est enregistrée tout au long du séquençage et interprétée pour obtenir une séquence de nucléotides. De plus, cette technologie utilise une structure en forme d'épingle liant ensemble les brins sens et antisens permettant un séquençage de chacun des brins afin d'obtenir une séquence consensus [190]. La technologie MinION permet un séquençage en temps réel rapide, de faibles coûts et l'appareil est de petit format. Elle permet de générer des lectures excédant les 150 kilobases facilitant ainsi l'assemblage *de novo*. En contrepartie, le taux d'erreur est relativement élevé, soit environ 12% réparti de la façon suivante : ~ 3% de mésappariements, ~ 4% d'insertions et ~ 5% de délétions. Récemment, une nouvelle technologie nommée PromethION utilisant le même principe que MinION a été révélée par ONT. Celle-ci permettrait le séquençage de 500 pb par seconde, entrant ainsi en compétition avec les technologies les plus populaires telles que Illumina HiSeq et PacBioRSII, mais ne serait pas encore disponible commercialement [182].

Tableau 2. **Comparaison des diverses technologies de séquençage.** Basé sur A. P. Derocles, S. *et al.* 2018. Biomonitoring for the 21st Century: Integrating Next-Generation Sequencing Into Ecological Network Analysis. *Advances in Ecological Research* [191].

<b>Méthode</b>	<b>Génération</b>	<b>Longueur des lectures (pb)</b>	<b>Taux d'erreur (%)</b>	<b>Nbr de lecture par cycle</b>	<b>Temps d'un cycle</b>	<b>Coût par million de bases (USD)</b>
<b>Sanger</b>	1 <sup>ère</sup>	600-1000	0,001	96	0.5-3h	500
<b>454 (Roche)</b>	2 <sup>ème</sup>	700	1	1 x 10 <sup>6</sup>	23h	8.57
<b>Ion Torrent</b>	2 <sup>ème</sup>	200	1	8.2 x 10 <sup>7</sup>	2-4h	0.1
<b>Illumina HiSeq (Cycle rapide)</b>	2 <sup>ème</sup>	2 x 250	0.1	1.2 x 10 <sup>9</sup> (En paires)	1-6 jours	0.04
<b>Illumina HiSeq (Haut débit)</b>	2 <sup>ème</sup>	2 x 125	0.1	8 x 10 <sup>9</sup> (En paires)	7-60h	0.03
<b>Solid</b>	2 <sup>ème</sup>	2 x 60	5	8 x 10 <sup>8</sup>	6 jours	0.11
<b>PacBio</b>	3 <sup>ème</sup>	1.0-1.5 x 10 <sup>4</sup>	13	3.5-7.5 x 10 <sup>4</sup>	0.5-4h	0.4-0.8
<b>Oxford Nanopore MinION</b>	3 <sup>ème</sup>	2.5 x 10 <sup>3</sup>	38	1.1-4.7 x 10 <sup>4</sup>	50h	6.44-17.90

## 4. Outils bio-informatiques

Avec la venue des technologies de séquençage, une quantité énorme de données est générée chaque jour. Par exemple en 2000, la banque de séquences d'acides nucléiques de GenBank comprenait déjà 8 214 000 entrées. Aujourd'hui, cette même banque possède plus de 213 380 000 entrées et ne cesse d'augmenter [192].

Par définition, la bio-informatique conceptualise la biologie en termes de molécules et applique des techniques informatiques pour comprendre et organiser l'information associée à ces molécules et ce, à grande échelle [193]. La bio-informatique a trois objectifs : organiser l'information afin de permettre aux chercheurs d'y accéder et d'en ajouter de nouvelles, développer des outils permettant l'analyse de l'information et utiliser ces mêmes outils afin d'interpréter les résultats de façon significative.

### 4.1 Banques de données

Il existe des banques de données de différentes natures regroupant les séquences d'ARN, d'ADN et de protéines de divers organismes étudiés. Ces banques regroupent généralement cinq types d'informations : des séquences d'ADN brutes, des séquences protéiques, des structures macromoléculaires, des séquences génomiques et d'autres informations reliées aux génomes entiers. Parmi celles-ci, on retrouve : GenBank, EMBL, DDBJ, SWISS-PROT, UniProt et Protein Data Bank (PDB) par exemple [194]. Il est possible de consulter ces banques afin de retrouver l'information reliée à un sujet d'intérêt, par exemple consulter la liste des génomes séquencés d'une certaine espèce bactérienne ou retrouver des informations concernant la fonction d'une certaine protéine.

### 4.2 Outils bio-informatiques

Depuis plusieurs l'année, une multitude d'outils bio-informatiques ont été développés afin de faciliter l'analyse des données générées avec les technologies de séquençage. En effet, il existe une grande variété d'outils permettant d'effectuer plusieurs tâches complexes telles que prédire les gènes codants pour des protéines d'un génome, chercher certains motifs conservés à

travers une séquence d'ADN, identifier des opérons biosynthétiques ou encore comparer un gène ou une protéine d'intérêt parmi les séquences disponibles dans les banques de données. Dans cette revue littéraire, différents outils bio-informatiques permettant la prédiction des protéines d'un génome bactérien, la recherche de protéines impliquées au sein d'un opéron de bactériocines et la comparaison de protéines à d'autres séquences protéiques connues seront présentés.

### **4.2.1 Prodigal**

Prodigal est un programme informatique dont la fonction est de prédire les gènes codants pour des protéines qui sont présents dans un génome bactérien à l'aide d'un algorithme. Avant l'arrivée de ce programme, certains autres tels que Glimmer et GenemarkHMM existaient déjà. Cependant, ces outils ne fonctionnent pas adéquatement sur des génomes dont le contenu G+C est trop faible ou trop élevé. De plus, ces programmes surestiment le nombre de gènes réellement présents à l'intérieur d'un génome, donnant ainsi un nombre élevé de fausses identifications [195]. Une récente étude a estimé que le pourcentage d'erreur de Prodigal est de 6,1%, un taux d'erreur plus faible que les programmes Glimmer3 (13,2%) et GeneMarkS (10,2%) actuellement disponible [196]. Prodigal est un programme à source libre et il est donc possible pour les utilisateurs de l'utiliser ou de le modifier à leur guise gratuitement. De plus, il permet l'analyse d'un génome complet très rapidement. Ce programme est disponible sur toutes les interfaces (Windows, Linux et Mac OS), mais demande une connaissance avancée du langage informatique et son utilisation est donc moins conviviale [197]. Une fois la prédiction des protéines effectuée grâce à Prodigal, il est possible d'utiliser d'autres logiciels permettant la détection de cibles spécifiques tels que les antibiotiques, les bactériocines, les vitamines et autres.

### **4.2.2 NeuBI (« Neural Bacteriocin Identifier »)**

Malgré le développement de différents logiciels de détection, les bactériocines restent encore difficiles à identifier. Tout d'abord, le nombre de séquences positives connues de bactériocines est faible, ce qui donne moins de force aux logiciels utilisant des banques de données pour détecter d'autres bactériocines. Ensuite, les séquences de bactériocines diffèrent beaucoup les unes des autres. Il est alors difficile d'identifier de nouvelles bactériocines en

utilisant des logiciels se basant sur la similarité de séquences pour faire la détection, comme le font les logiciels antiSMASH, Prism et BAGEL. En 2018, NeuBI est développé par Hamid et Friedberg (2018). Cet outil utilise une méthode d'identification différente des précédents logiciels, soit en utilisant la représentation « word embedding ». De plus, à l'aide d'un réseau neuronal récurrent, NeuBI peut distinguer les séquences correspondant réellement aux bactériocines. Il a été démontré que ce nouvel outil permet une meilleure détection et classification des séquences de bactériocines comparativement aux algorithmes et logiciels précédents [198]. En donnant un fichier comprenant les protéines prédites à l'intérieur d'un génome d'intérêt à ce programme informatique, ce dernier crée un fichier de résultats associant chacune des séquences protéiques à un certain pourcentage. Ce pourcentage représente la probabilité qu'une séquence protéique soit impliquée au sein d'un opéron de bactériocines. Selon les recommandations du scripteur de ce programme, les séquences protéiques avec un pourcentage de 95% et plus sont des protéines avec un fort potentiel [199]. Une fois la prédiction réalisée avec le programme NeuBI, il est possible d'utiliser d'autres outils bio-informatiques afin d'associer chacune des séquences d'acides aminés à des protéines connues et ainsi, comprendre leur rôle au sein de l'opéron de bactériocines.

### **4.2.3 BLAST et ses variantes**

BLAST (« Basic Local Alignment Search Tool») est un outil permettant la recherche de séquences similaires à une séquence d'intérêt. Le « National Center for Biotechnology Information » (NCBI) offre cet outil sur une interface web (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ou de façon autonome sur Linux et Mac OS [200]. Il existe différentes versions de BLAST permettant l'alignement de séquences de diverses natures. La version de base (BLAST) permet de comparer une séquence de nucléotides à d'autres séquences de même nature déjà connues. BLASTp permet de comparer une séquence protéique à une banque de données contenant les séquences de même nature. tBLASTn permet de traduire une séquence protéique en séquence nucléotidique, puis de comparer cette dernière à une banque de séquences nucléotidiques. À l'inverse, BLASTx traduit une séquence nucléotidique en séquence protéique, puis compare celle-ci à une banque de séquences de même nature. Finalement, tBLASTx traduit une séquence nucléotidique d'intérêt ainsi que celles d'une banque de données en séquences protéiques, puis celles-ci sont comparées en utilisant

l’algorithme BLASTp [201]. Le rapport de résultat généré par BLAST est composé des éléments suivants : la description des séquences similaires à la séquence d’intérêt, les scores maximaux et totaux obtenus lors de l’alignement de ces séquences, le pourcentage de couverture, la valeur statistique E permettant à l’utilisateur d’évaluer la pertinence d’un certain résultat, le pourcentage d’identité entre la séquence d’intérêt et une séquence observée ainsi qu’un numéro permettant d’accéder aux informations des séquences observées dans le rapport de résultat [202]. La Figure 2 permet d’observer le rapport de résultat généré lors de l’utilisation de BLAST avec le gène de la toxine alpha de *C. perfringens*. Il est donc très utile d’utiliser le logiciel BLAST et ses variantes afin d’identifier à quoi correspond certaines séquences nucléotidiques ou protéiques d’intérêt, par exemple à la suite d’une analyse effectuée avec le logiciel NeuBI.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain Cp2 alpha toxin gene, partial cds</a>	737	737	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KY388861.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain CP322 phospholipase C alpha-toxin (plc) gene, complete cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">MH900563.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain CP157 phospholipase C alpha-toxin (plc) gene, complete cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">MH900560.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain CP457 phospholipase C alpha-toxin (plc) gene, complete cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">MH900559.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain CP450 phospholipase C alpha-toxin (plc) gene, complete cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">MH900558.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain MF-CA1 phospholipase C (plc) gene, complete cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">MK599266.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain EHE-NE18 chromosome, complete genome</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">CP025501.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Synthetic construct alpha-beta2-epsilon-beta1 fusion protein gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">KY048192.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain LLY_N11 chromosome, complete genome</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">CP023410.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain EHE-NE18 genome</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">CP017106.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Synthetic construct alpha-beta2-epsilon-beta1 fusion protein gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">KX101112.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain Del1 genome</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">CP019576.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain CDDD phospholipase C (plc) gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">KY038859.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain ST43 alpha toxin gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">KX711226.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain ST42 alpha toxin gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">KX711225.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain JP55, complete genome</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">CP010993.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Synthetic construct alpha-beta2 fusion gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">KR998052.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain CW_2b alpha toxin gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">JQ071557.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Clostridium perfringens strain CN_3a alpha toxin gene, partial cds</a>	736	736	99%	0.0	100.00%	<a href="#">JQ071554.1</a>

Figure 3. **Rapport de résultat généré lors de l’analyse BLAST du gène de la toxine alpha de *Clostridium perfringens*.** L’analyse présentée a été effectuée selon les paramètres par défaut de l’outil BLAST (megablast, banque de donnée « Nucleotide collection »).

## Hypothèse et objectifs

L'hypothèse de ce projet de recherche était la suivante : *Clostridium perfringens* a la capacité de produire une ou plusieurs bactériocines différentes de la perfrine qui sont inconnues jusqu'à présent.

Pour répondre à cette hypothèse, différents objectifs ont été fixés. Le premier d'objectif consistait à identifier des souches commensales de *C. perfringens* ayant une activité antimicrobienne contre des souches pathogènes de *C. perfringens*. Le second objectif était d'isoler et de caractériser les bactériocines produites par une des souches commensales sélectionnées dans l'objectif 1. Finalement, le dernier objectif était de séquencer le génome de cette souche commensale et d'utiliser différents outils bio-informatiques afin de prédire les gènes participant à l'opéron des bactériocines observées au cours du second objectif.

# Article

## **Bacteriocins produced by commensal *Clostridium perfringens* strains as a new alternative to control necrotic enteritis**

Nicolas Deslauriers<sup>1</sup>, Frédéric Raymond<sup>2</sup> and Martine Boulianne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Chair in Poultry Research, Department of Clinical Sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St.Hyacinthe, Qc, Canada

<sup>2</sup>Institute of Nutrition and Functional Foods, Université Laval, Québec, Qc, Canada

\*Corresponding author

E-mail: [martine.boulianne@umontreal.ca](mailto:martine.boulianne@umontreal.ca) (MB)

Nicolas Deslauriers carried out the experiment and wrote the manuscript, Frédéric Raymond helped with bioinformatic analyses and Martine Boulianne conceived the original idea.

In preparation, 2019

## Abstract

With the current increase in antimicrobial resistance and consumers' concern, new alternatives are needed to control necrotic enteritis (NE), a disease that causes billions of dollars in economic losses to the poultry industry worldwide. Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria to kill or inhibit the growth of other bacterial competitors. Perfrin is the only reported bacteriocin associated with pathogenic strains of *Clostridium perfringens*, the causal agent of NE. The aims of this study were to screen for commensal *Clostridium perfringens* strains with an antimicrobial activity against *C. perfringens* pathogenic strains and to identify and characterize the produced bacteriocins. Commensal *C. perfringens* strains were selected from our bacterial collection. Antimicrobial activity of those selected strains was tested against *C. perfringens* pathogenic strains using the agar spot test method. A commensal strain showing antimicrobial activity was cultured and its bacteriocins were partially purified using the ammonium sulfate precipitation method and HPLC. After each chromatography, antimicrobial activity of fractions was tested using the method described above to choose fractions containing bacteriocins. Enzyme susceptibility, heat and pH stability and the estimated molecular weight of the bacteriocins were characterized. The studied bacteriocins were sensitive to proteinase K, thermolabile, stable at pH between 4 and 8 and their molecular weight higher than 30 kDa. A commensal and bacteriocin-producing strain genome was sequenced and bioinformatic analyses were done. We found 28 potential bacteriocin sequences, but 4 of them seemed to be promising as they may have a potential role to play in a bacteriocin cluster. In this study, commensal *C. perfringens* strains producing bacteriocins active against pathogenic strains have been identified. These bacteriocins could be an interesting alternative to antibiotics for the control of necrotic enteritis but further data is still needed.

## Introduction

For the past several years, an increase in antibiotic resistance has been observed worldwide. This increase is mostly related to societal pressures, inappropriate uses of antibiotics, inadequate diagnostics, hospital use and agricultural use [1]. To respond to consumers' concerns, the Canadian poultry industry has opted for the preventive withdrawal of antibiotics considered of human importance by 2020 [2]. Some of these antibiotics, such as bacitracin and avilamycin [3, 4], are important preventive tools for necrotic enteritis (NE) hence emphasizes the need for new alternatives to control this deadly disease that causes billions of dollars in economic losses to the poultry industry worldwide. Many alternatives such as bacteriophages, essential oils or organic acids have already been suggested to replace antibiotics [5-8]. Bacteriocins are ribosomal peptides synthesized by bacteria to kill or inhibit other microorganisms. These antimicrobial peptides can have a narrow spectrum, by affecting closely related bacteria, or a broad spectrum by affecting a large variety of bacteria [9]. Bacteriocins are classified in three different classes divided into subclasses. Class I contains low molecular weight bacteriocins that are modified post-translationally. This class is subdivided into class Ia (lantibiotics), class Ib (labyrinthopeptins) and class Ic (sanctibiotics). Class II is composed of non-modified, small heat-stable bacteriocins. This class is subdivided into class IIa (pediocin-like bacteriocins), class IIb (two-peptides bacteriocins), class IIc (circular bacteriocins) and class IId (unmodified, linear and non-pediocin-like bacteriocins). Class III contains high molecular weight and heat labile bacteriocins [10]. Perfrin is the only reported and well characterized bacteriocin associated with pathogenic strains of *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), the causal agent of NE. Perfrin is a 11,5 kDa protein that is active over a wide pH-range, thermolabile and sensitive to proteases activity. No homology with other known bacteriocins is found [11]. Lately, during one of our experimental trial, we came across chickens carrying a commensal *C. perfringens* strain which appeared to have a protective effect and prevented the development of NE lesions (Boulianne M., Poultry Research Chair, University of Montreal, unpublished). We hypothesized that commensal *C. perfringens* strains can produce bacteriocins inhibiting the growth of other *C. perfringens* strains including pathogenic ones. In this present study, commensal bacteriocin producing *C. perfringens* strains were identified and their bacteriocins were characterized.

## **Materials et methods**

### ***Clostridium perfringens* strains**

Ten commensal *C. perfringens* strains (CP18, CP123, CP538, CP425, CP472, CP247, CP653, CP669, CP0773 and CP1676) isolated from healthy chicken of different farms were selected from our bacterial collection. Those strains have been characterized in the past and were considered commensal when not carrying virulence factors genes such as *cna* and *netB*, encoding respectively an adhesin and a pore-forming toxin recognized for playing major roles in necrotic enteritis in chicken. Furthermore, selected commensal strains were perfrin negative, as we wanted to make sure we did not isolate a known bacteriocin. Four pathogenic *C. perfringens* strains (STF2003-1256, CP094, SHY07-383 and 2006-4758) isolated from clinical cases were also selected from our bacterial collection. Pathogenic strains carried both *cna* and *netB* genes and were perfrin positive or negative (Table 1).

### **Selection of bacteriocin producing strains**

Bacteriocin producing strains were selected when showing an antimicrobial activity against pathogenic strains using the agar spot test [11]. For this purpose, commensal strains were cultured in brain heart infusion (BHI) broth (BD) and pathogenic strains were cultured on blood agar (Thermo Scientific™) at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen, Thermo Scientific™). Supernatants were collected after centrifugation and remaining bacteria were removed by a 0,2 µm filtration. Bacterial suspensions from pathogenic strains were made in sterile water and adjusted to a MacFarland 0.5 standard (Sensititre™, Thermo Scientific™) using a nephelometer (Sensititre™, Thermo Scientific™). Confluent lawns of growth were made by streaking a swab of adjusted bacterial suspensions on the surface perfringens agar base plates (Thermo Scientific™). A drop of 10 µL of each commensal supernatant were spotted on these lawns and antimicrobial activity was observed after an overnight incubation (37°C, under anaerobic conditions) by measuring growth inhibition zones.

### **Bacteriocin production**

A selected commensal strain was cultured in BHI broth at 37°C under anaerobic conditions and the supernatant was collected after a centrifugation (5 000 RPM, 45 mins, 4°C)

and sterilized by a 0,2 µm filtration. Proteins were precipitated using 50% ammonium sulfate after an overnight incubation at 4°C followed by a centrifugation (17 000 × g, 2h, 4°C). The pellet was resuspended in 10 mL sterile PBS (pH 7.0) for bacteriocin characterization or acetic acid (50 mM, pH 5.0) for HPLC separation. The crude extract was desalted using PD-10 desalting columns (GE Healthcare). Then, the crude extract was tested for its antimicrobial activity against a sensitive pathogenic strain using the agar spot test to confirm the bacteriocin(s) presence.

## **Bacteriocin purification**

The crude extract was loaded onto a SP-Sepharose cation exchange column (GE Healthcare) in acetic acid buffer (50 mM, pH 5.0). Proteins were eluted using stepwise increases (0%; 2,5%; 5,0%; 7,5%; 10,0%; 12,5%; 15,0%; 17,5%; 20,0%; 30,0%; 40,0%; 50,0% and 100,0%) of acetic acid (50 mM, pH 5.0) + 1 M NaCl by HPLC (ÄKTA purifier, GE Healthcare). Collected fractions were tested for their antimicrobial activity using the agar spot test described above. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of active fractions was done to identify the bacteriocins corresponding bands and to confirm the purification step.

## **Crude extract characterization**

### **Enzyme susceptibility**

A 10 mg/mL proteinase K (Fisher BioReagents™) solution was made and protease susceptibility was determined after incubating the crude extract with final concentrations of 1 mg/mL and 0,1 mg/mL of proteinase K at 37°C for one hour. After incubation, 5 µL of the reaction was spotted on a sensitive pathogenic lawn and the plates were observed for growth inhibition zones after an overnight incubation at 37°C under anaerobic conditions. Five µL of the crude extract not treated with enzyme was used as a control.

### **Heat stability**

One milliliter of the crude extract was incubated at 30°C in a dry bath (Biological Indicator Incubator, model MiniT-3, MBI lab equipment) and 100°C (boiled in water) for 10, 30 and 60 min. After cooling at room temperature, the antimicrobial activity of each treatment

was tested as described previously. Five  $\mu\text{L}$  of the crude extract stored at  $4^{\circ}\text{C}$  was used as a control.

### **pH stability**

The crude extract was adjusted to pH values ranging between 4.0 and 10.0 (increments of 2 pH units) using HCl (1 N) or NaOH (1 N) and incubated for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . The effect of each treatment on antimicrobial activity was tested as describe above. Five  $\mu\text{L}$  of the crude extract stored at  $4^{\circ}\text{C}$  and sterile PBS adjusted to each tested pH values were used as a control.

### **Molecular weight estimation**

One milliliter of the crude extract was separated by molecular weight using centrifugal units (Millipore Sigma<sup>TM</sup>, Thermo Scientific<sup>TM</sup>) with 10 kDa and 30 kDa membranes. After a centrifugation ( $14\ 000 \times g$ , 30 min), 5  $\mu\text{L}$  of the fractions below and above the mentioned molecular weight values were tested for their antimicrobial activity using the agar spot test against a sensitive pathogenic strain (2006-4758). Five  $\mu\text{L}$  of the crude extract not centrifuged was used as a control.

### **Bioinformatic analysis**

#### **DNA extraction and genome sequencing**

DNA extraction was performed following the protocol described by Pospiech and Neumann, 1995 [12]. Briefly, strain CP1676 was cultured from a frozen stock on blood agar (Thermo Scientific<sup>TM</sup>). Using a swab, colonies were harvested and resuspended into sterile water. After centrifugation, the pellet was resuspended in SET buffer. The sample was incubated with lysozyme and RNase A, then SDS and proteinase K were added. After several inversions, 5 M NaCl and chloroform were added followed by a centrifugation. Aqueous phase was collected, and isopropanol was added to the sample followed by a centrifugation. The pellet was washed twice with 70% ethanol and dried. Finally, the pellet was resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of TE buffer. DNA concentration was measured by Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific<sup>TM</sup>), adjusted to 200 ng/ $\mu\text{L}$  with sterile water, and the sample was sent to McGill university for PacBio sequencing according to Genome Quebec instructions. DNA sequencing was done using a PacBio RSII sequencer and genome assembly was achieved using the HGAP workflow [13].

#### **Genome bacteriocins mining of strain CP1676**

Protein-coding genes were predicted from strain CP1676 genome using Prodigal v2.6.3 (<https://github.com/hyattpd/Prodigal>) on Linux. Then, the protein file was used as input for NeuBI (<https://github.com/nafizh/NeuBI>), a recurrent neural network-based software to predict bacteriocins from protein sequences. Protein sequences with a score higher than 95% were considered as bacteriocins or bacteriocins associated proteins. A threshold of 95% of being a bacteriocin sequence was used as suggested by the NeuBI developer.

Protein sequences concurring to bacteriocins were blasted using BLASTp against the non-redundant (nr) protein database. Results with an E-value higher than  $1e-25$  and an identity score higher than 90% were considered good matches.

## Results

### Antimicrobial activity of commensal strains

From the ten commensal *C. perfringens* strains tested, three showed a significant antimicrobial activity against two of the four selected pathogenic strains (Figure 1). Strain CP538 showed antimicrobial activity against strains CP094 (low inhibition, <5 mm) and 2006-4758 (moderate inhibition, >5 mm but <10 mm); strain CP669 showed antimicrobial activity against strains CP094 (moderate inhibition, >5 mm but <10 mm) and 2006-4758 (strong inhibition, >10 mm) and strain CP1676 showed antimicrobial activity against strain CP094 (low inhibition, <5 mm) and 2006-4758 (moderate inhibition, >5 mm but <10 mm). Strain CP0773 showed antimicrobial activity against strain 2006-4758, but it was not significant (slightly detectable inhibition and presence of resistant colonies). Pathogenic strains STF2003-1256 and SHY07-383 were not sensitive to all tested supernatants (Table 2). Because strain CP1676 has already been tested in a chicken intestinal loop model in a previous study and was not able to reproduce necrotic enteritis, it was selected to produce and characterize its bacteriocin(s)

### Partial purification of the crude extract

Antimicrobial activity was only detected in fractions between 5.0% and 12.5% of elution buffer (Table 3). All other fractions were discarded, and active fractions were pooled for the next purification step. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed the partial purification of the bacteriocin, but the band corresponding to the bacteriocins could not be identified.

### Characterization of the crude extract

No antimicrobial activity was observed after incubating the crude extract at both tested proteinase K concentration (Fig 2). Incubation at 30°C had no effect on the crude extract's antimicrobial activity after 10, 30 and 60 min. However, incubation at 100°C completely inactivated the antimicrobial activity after 10, 30 and 60 min (Fig 3). Growth inhibition zones were observed at pH between 4 and 8, but no antimicrobial activity was detected at pH 10 (Fig 4). No antimicrobial activity was detected with fractions below 10 kDa and 30 kDa, but growth inhibition zones were observed with fractions above 10 KDa and 30 Kda (Fig 5). The bacteriocin(s) are sensitive to proteinase K and thermolabile. Those are stable at a pH range between 4 and 8 but lose their activity at pH 10. Finally, the bacteriocin(s) estimated molecular weight is higher than 30 kDa.

## **DNA extraction and genome sequencing**

A total of 647 ng/μL of DNA was obtained after the DNA extraction of strain CP1676. DNA sequencing and genome assembly resulted in four large contigs. The estimated genome size was 3 Mb with a 28.29% GC content. All contigs BLAST hits corresponded to the bacterium *Clostridium perfringens* with high identity percentage (>90%) and low E-value (<1e-50).

## **Predicted bacteriocins and bacteriocins associated proteins**

Using Prodigal, a total of 3547 protein-coding genes were predicted from the CP1676 genome. From these sequences, 28 had a bacteriocin probability higher than 95% when analyzed by NeuBI and were considered of interest. These proteins were blasted using mentioned parameters and the results are showed in Table 4. Briefly, the studied protein sequences were associated with the spore coat formation, production, modification and transport enzymes, metabolic enzymes, bacteriophage component, metallopeptidase, DNA transport and repair, aquaporin and oxidative stress response.

## **Discussion**

Only three of the ten tested commensal *C. perfringens* strains were able to inhibit the growth of two pathogenic *C. perfringens* strains. Interestingly, strains STF2003-1256 and SHY07-383 were not sensitive to all tested supernatants suggesting that they possess immunity

mechanisms to counter the bacteriocins activity. Bacteriocins gene clusters are composed of synthesis, regulation, modification, transport and immunity genes [14, 15]. Carrying the same bacteriocin gene cluster as the commensal strains would be a possible explanation to the pathogenic strains' immunity. Screening strains STF2003-1256 and SHY07-383 for the novel bacteriocin gene cluster will confirm that hypothesis.

Agar spot test results after ion exchange purification showed that the bacteriocin(s) were in fractions between 5.0% and 12.5% of elution buffer. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis following the protein separation by HPLC showed that the purification achieved was only partial (presence of many proteins in collected fractions showing antimicrobial activity). Thus, bands corresponding to bacteriocins could not be identified. A further purification step could provide fractions with isolated bacteriocins (one or two proteins by fraction)

Bacteriocin(s) were inactivated by both proteinase K concentration, incubation at 100°C and at pH 10. These results suggest that the studied antimicrobial peptides are sensitive to proteases activity, thermolabile and stable at pH between 4 to 8. We estimated that the bacteriocins molecular weight was higher than 30 kDa as no antimicrobial activity was detected below this value. Based on these results, we concluded that bacteriocins of this study belong to the bacteriocin class III. This class includes high molecular weight and heat labile bacteriocins [16]. Little is known about this class. Colicin, helveticins and enterolysins produced by *Escherichia coli*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus* and *Enterococcus faecalis* respectively are members of the class III [10]. Sun *et al.* showed that helveticin-M disrupts the cell wall of Gram-positive bacteria and disorganized the outer membrane of Gram-negative bacteria [17]. Even if its activity is more bacteriostatic than bactericidal, it is interesting that a class III bacteriocin has the potential to affect both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

*C. perfringens* strain CP1676 genome sequencing resulted into 4 large contigs with a total estimated size of 3 Mb and a 28,29% GC content. Those results are similar to others *C. perfringens* genome sequencing such as strains 11 (3,2 Mb with 28,1% GC content) and TAM-NE43 (3,3 Mb with 28,1% GC content). Furthermore, the blasted contigs were corresponding to the organism *Clostridium perfringens* with high identity scores and low E-values showing that the CP1676 genome sequencing was done correctly.

A total of 28 potential bacteriocins proteins were predicted by the NeuBI program. BLASTp results showed potential candidates that could be parts of a bacteriocin cluster.

Sequence # 13 was associated to a M23 family metallopeptidase. Members of this family are primarily bacterial peptidoglycan hydrolases [18]. Some bacteriocins such as lysostaphin possess key features of the family M23 peptidases in their catalytic domain and are active against staphylococci by degrading their cell wall [19, 20]. Furthermore, lysostaphin belongs to the bacteriocin class III. These characteristics are similar to the bacteriocins characteristics observed in this study. Thus, sequence #13 could correspond to the bacteriocins observed in this study and may have a mode of action similar to lysostaphin. From the BLASTp results, we also found sequences associated with proteins involved in protein modification. Sequence # 2 corresponded to a radical *S*-adenosylmethionine (SAM) protein. Radical SAM family members catalyse many modification reactions such as methylation, sulfur insertion ring and isomerization. They are involved in vitamin, cofactor, antibiotic and herbicide biosynthesis [21]. Sequence # 7 was associated with a sulfur transferase, an enzyme that catalyses the transfer of a sulfane atom to a receptor molecule [22]. Such enzymes had been observed in bacteriocin clusters and were hypothesized to modify the bacteriocin backbone, a step of the bacteriocin maturation [23]. Finally, sequence # 28 concorded to a cytosine deaminase, an enzyme that catalyses the conversion of cytosine into uracil [24]. This enzyme was reported to convert a pro-drug, 5-fluorocytosine (5-FC), to the toxic form 5-fluorouracil (5-FU) to treat brain cancer in rats [25]. Some bacteriocins are synthetized as an inactive form and need the action of a modification enzyme to be biologically functional [26]. Therefore, it could be possible that the cytosine deaminase plays a role in the modification of the antimicrobial peptide and leads to its activation. Because bacteriocins clusters are generally composed of structural, modification, regulation, transport and immunity genes [27], we hypothesized that the discussed sequences could be part of the studied bacteriocin gene cluster.

In conclusion, novel bacteriocins from a crude extract of commensal *C. perfringens* strain were partially purified and characterized. The antimicrobial peptides molecular weight is higher than 30 kDa and they are thermolabile. Therefore, we concluded that the studied bacteriocins belong to the bacteriocin class III. Using bioinformatic tools, we also found protein sequences associated with a M23 metallopeptidase and modification enzymes that could be part of the bacteriocin gene cluster. Further data on *Clostridium perfringens* bacteriocins are needed as new alternatives to control necrotic enteritis are essential.

## Acknowledgements

The authors of this study acknowledge the support provided by the Plateforme de bioanalyse team of the Université de Sherbrooke: Lounes Haroune and his team.

## References

1. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Causes of Antimicrobial (Drugs) Resistance: 2019 [Repéré le 19 août 2019]. Disponible: <https://www.niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes>
2. Les Producteurs de poulet du Canada. Antibiotiques: 2019 [Repéré le 19 août 2019]. Disponible: <https://www.producteursdepoulet.ca/les-antibiotiques/>
3. Riaz A, Umar S, Tanveer Munir M, Tariq M. Replacements of Antibiotics in the Control of Necrotic Enteritis: A Review. *Sci Lett*. 2017;5:208-16.
4. Paradis MA, McMillan E, Bagg R, Vessie G, Zocche A, Thompson M. Efficacy of avilamycin for the prevention of necrotic enteritis caused by a pathogenic strain of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Pathology*. 2016;45(3):365-9.
5. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017;8(3):162-73.
6. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe*. 2019;25(2):219-32.
7. Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim Nutr*. 2018;4(2):126-36.
8. Dittoe DK, Ricke SC, Kiess AS. Organic Acids and Potential for Modifying the Avian Gastrointestinal Tract and Reducing Pathogens and Disease. *Front Vet Sci*. 2018;5:216.
9. Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front Microbiol*. 2018;9:594.
10. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb Pathog*. 2019;128:171-7.

11. Timbermont L, De Smet L, Van Nieuwerburgh F, Parreira VR, Van Driessche G, Haesebrouck F, et al. Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Vet Res.* 2014;45:40.
12. Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 1995;11(6):217-8.
13. Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods.* 2013;10:563.
14. Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules.* 2017;22(8).
15. Ishibashi N, Himeno K, Masuda Y, Perez RH, Iwatani S, Zendo T, et al. Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(21):6647-55.
16. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014;5:241.
17. Sun Z, Wang X, Zhang X, Wu H, Zou Y, Li P, et al. Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2018;45(3):213-27.
18. Grabowska M, Jagielska E, Czapinska H, Bochtler M, Sabala I. High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue. *Scientific Reports.* 2015;5:14833.
19. Sabala I, Jagielska E, Bardelang PT, Czapinska H, Dahms SO, Sharpe JA, et al. Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. *FEBS J.* 2014;281(18):4112-22.
20. Bastos MdCdF, Coutinho BG, Coelho MLV. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals.* 2010;3(4).
21. Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, Miller NE. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic acids research.* 2001;29(5):1097-106.
22. Papenbrock J, Schmidt A. Characterization of a sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry.* 2000;267(1):145-54.

23. Holmes NA, Innocent TM, Heine D, Bassam MA, Worsley SF, Trottmann F, et al. Genome Analysis of Two Pseudonocardia Phylotypes Associated with Acromyrmex Leafcutter Ants Reveals Their Biosynthetic Potential. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:2073-.
24. Minton NP, Ehsaan M, Humphreys CM, Little GT, Baker J, Henstra AM, et al. A roadmap for gene system development in Clostridium. *Anaerobe*. 2016;41:104-12.
25. Ichikawa T, Tamiya T, Adachi Y, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, et al. In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(1):74-82.
26. And HC, Hoover DG. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003;2(3):82-100.
27. Lafuente-Rincón DF, Chávez Velásquez TE, De la Fuente-Salcido NM. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: Features and biotherapeutic approach *african Journal of Microbiology Research*. 2016:1873-9.

## Figures and tables

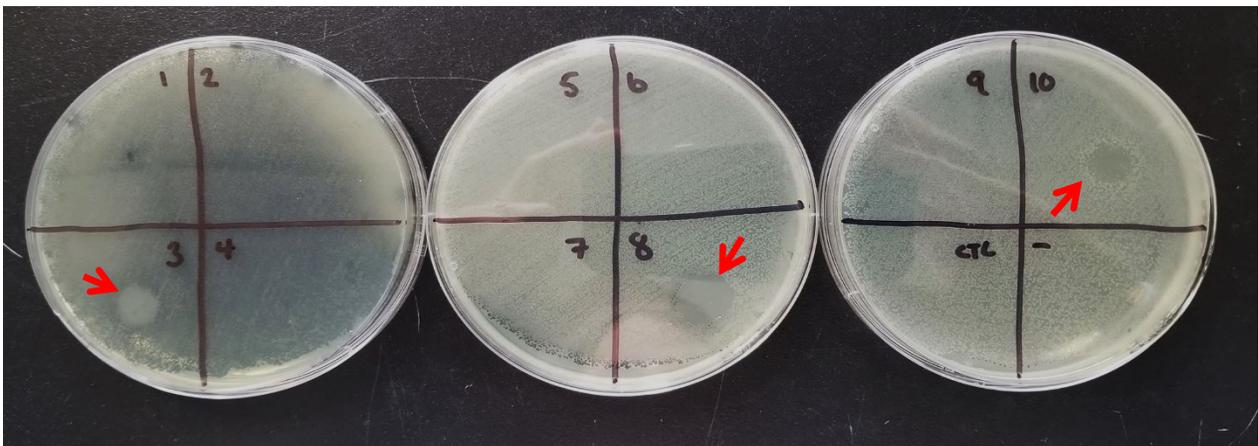


Figure 1. Agar spot test showing *C. perfringens* commensal strains antimicrobial activity against a selected *C. perfringens* pathogenic strain. From 1 to 10, commensal strains filtered supernatant (10  $\mu$ L); control, BHI medium (10  $\mu$ L); -, strain 2006-4758 only. Red arrows are showing the growth inhibition zones.

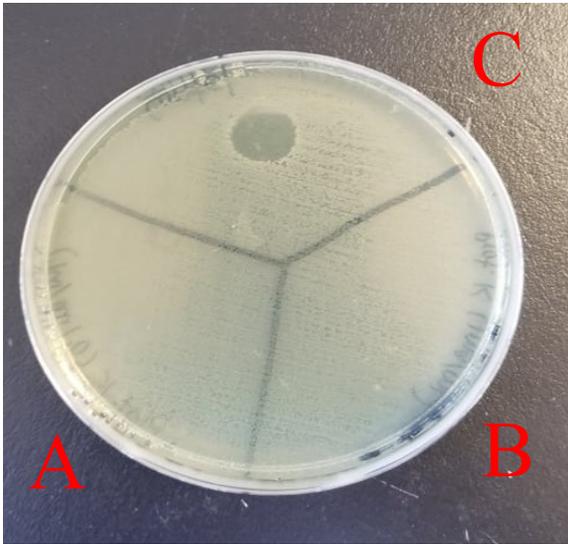


Figure 2. **Bacteriocin crude extract enzyme susceptibility assay.** The bacteriocin solution was incubated with 0,1 mg/mL (A) and 1 mg/mL (B) of proteinase K at 37°C for one hour. The bacteriocin solution without proteinase K (C) was added as a control. Five  $\mu$ L of each treatment was tested against a selected *C. perfringens* pathogenic bacterial lawn.

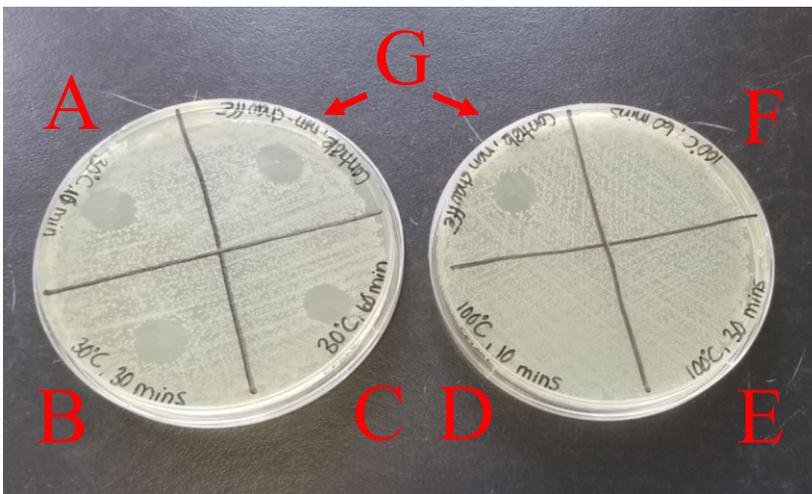


Figure 3. **Bacteriocin crude extract heat stability assay.** A, 10 min at 30°C; B, 30 min at 30°C; C, 60 min at 30 °C; D, 10 min at 100°C; E, 30 min at 100°C; F, 60 min at 100°C and G, control (stored at 4°C). Five  $\mu$ L of each treatment was tested against a selected *C. perfringens* pathogenic bacterial lawn.

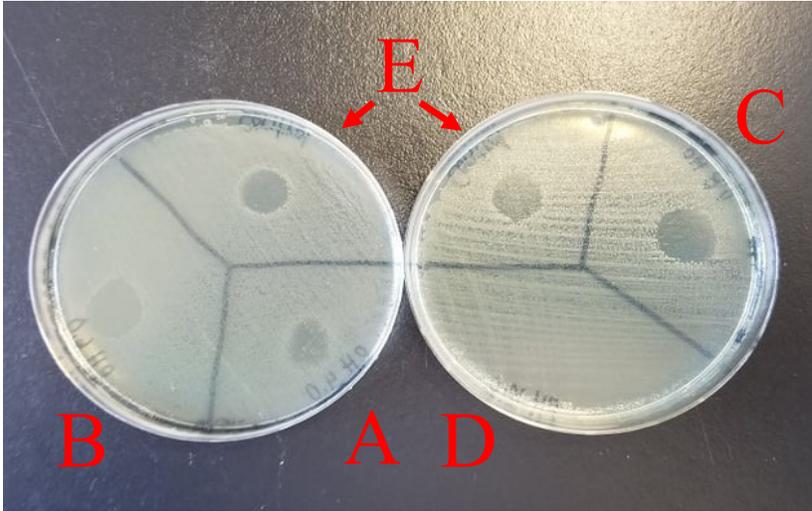


Figure 4. **Bacteriocin crude extract pH stability assay.** The bacteriocin solution was adjusted to pH 4 (A), 6 (B), 8 (C) and 10 (D). The solution not adjusted (E) was added as a positive control. Five  $\mu\text{L}$  of each treatment was tested against a selected pathogenic *C. perfringens* pathogenic bacterial lawn.

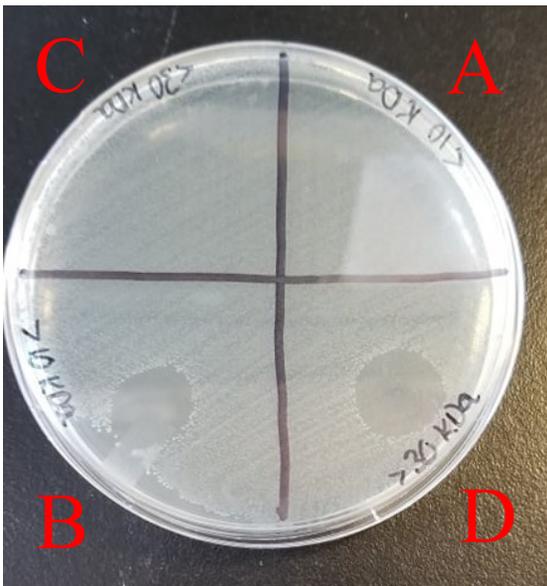


Figure 5. **Molecular weight estimation assay.** Bacteriocin solution was separated by molecular weight using centrifugal units with 10 kDa and 30 kDa membranes. Five  $\mu\text{L}$  of the fractions below (A) and above (B) 10 kDa as well as fractions below (C) and above (D) 30 kDa were tested against a selected *C. perfringens* pathogenic bacterial lawn. Five  $\mu\text{L}$  of the crude extract not centrifuged was used as a control.

**Table 1. Selected *C. perfringens* commensal and pathogenic strains tested in this study**

Strains	Virulence factors		
	<i>cna</i>	<i>netB</i>	<i>perfrin</i>
CP18	-	-	-
CP123	-	-	-
CP538	-	-	-
CP425	-	-	-
CP472	-	-	-
CP247	-	-	-
CP653	-	-	-
CP669	-	-	-
CP0773	-	-	-
CP1676	-	-	-
STF2003-1256	+	+	+
CP094	+	+	-
SHY07-383	+	+	-
2006-4758	+	+	+

Table 2. *C. perfringens* commensal strains showing antimicrobial activity against *C. perfringens* pathogenic strains.

<i>C. perfringens</i> commensal strains										
<i>C. perfringens</i> pathogenic strains	CP18	CP123	CP538	CP425	CP472	CP247	CP653	CP669	CP0773	CP1676
<b>STF2003-1256</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CP094</b>	-	-	+	-	-	+	-	++	-	+
<b>SHY07-383</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2006-4758</b>	-	-	++	-	-	-	-	+++	+/-	++

-, no inhibition; +/-, slightly detectable (<5mm and presence of resistant colonies); +, low inhibition zone (<5 mm); ++ moderate inhibition zone (>5 mm but <10 mm); +++ strong inhibition zone (> 10 mm)

Table 3. Characterization of the *C. perfringens* bacteriocin crude extract

Characteristics	Bacteriocin activity	
Enzyme susceptibility	Proteinase K (0,1 mg/mL)	-
	Proteinase K (1 mg/mL)	-
	Control (not treated with enzyme)	+
Heat stability	10, 30 or 60 min at 30°C	+
	10, 30 or 60 min at 100°C	-
	Control (stored at 4°C)	+
pH stability	4	+
	6	+
	8	+
	10	-
	Control (pH not adjusted)	+
HPLC (ion exchange)		
Salt gradient (%)	0 (crude extract injection)	-
	2,5	-
	5,0	+
	7,5	+
	10	+
	12,5	+
	15,0	-
	17,5	-
	20	-
	30	-
	50	-
100	-	

-, no activity; +, activity

Table 4. BLASTp alignments results of the predicted CP1676 bacteriocins

Sequence #	BLASTp results	E-value	Identity (%)
1	Spore coat protein	7e-54	100,00
2	Radical SAM protein	8e-131	97,87
3	Family 20 glycosylhydrolase	2e-123	100,00
4	Tim44 domain-containing protein	3e-56	96,91
5	Hypothetical protein	1e-61	100,00
6	HK97 gp10 family phage protein	1e-95	96,45
7	Sulfurtransferase	1e-133	100,00
8	Hypothetical protein	2e-131	100,00
9	DUF1097 domain-containing protein	8e-102	100,00
10	Hypothetical protein	7e-91	100,00
11	Hypothetical protein	4e-51	98,85
12	Alpha/beta hydrolase	8e-133	99,47
13	M23 metallopeptidase	4e-125	100,00
14	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	2e-128	100,00
15	RusA family crossover junction endodeoxyribonuclease	8e-131	98,40
16	Aquaporin family member	6e-128	100,00
17	Sugar O-acetyltransferase	1e-135	100,00
18	Hypothetical protein	3e-119	100,00
19	Single-stranded DNA-binding protein	9e-103	100,00
20	DNA translocase FtsK	2e-86	93,75
21	Hypothetical protein	3e-46	100,00
22	Rubrerythrin	2e-84	97,73
23	Hypothetical protein	5e-130	99,47
24	Hypothetical protein	2e-126	100,00
25	HesB-like protein	2e-75	100,00
26	Hypothetical protein	6e-47	100,00
27	DUF4236 domain-containing protein	1e-32	95,45
28	Cytosine deaminase	4e-50	100,00

## Discussion

Parmi les dix souches commensales de *C. perfringens* testées, seulement trois avaient la capacité d'inhiber la croissance de deux des souches pathogènes de *C. perfringens* utilisées. Les souches pathogènes STF2003-1256 et SHY07-383 étaient insensibles à tous les surnageants testés. À la suite de la purification partielle des bactériocines par chromatographie échangeuse d'ions, les résultats des tests d'inhibition sur gélose ont démontré que l'activité antimicrobienne était située dans les fractions qui étaient récoltées entre 5,0 % et 12,5 % de tampon d'éluion. Une analyse par gel de polyacrylamide a permis d'observer la purification partielle obtenue après séparation par chromatographie (plusieurs protéines par fraction), cependant aucune bande n'a pu être associée à l'activité antimicrobienne observée puisqu'il y avait trop de bandes présentes dans chacune des fractions actives. Les bactériocines étudiées dans ce projet étaient inactivées après une incubation en présence des deux concentrations de protéinase K utilisées, après une incubation à 100° C et après une incubation à un pH de 10. Nous avons estimé que le poids moléculaire des bactériocines était supérieur à 30 kDa puisqu'aucune activité antimicrobienne n'a été détectée sous cette valeur. Le séquençage du génome de la souche CP1676 a permis d'obtenir quatre contigs larges dont le poids total a été estimé à 3 Mb avec un contenu GC de 28,29 %. Un total de 28 bactériocines potentielles a été prédit à l'aide du programme informatique NeuBI. Parmi les résultats de BLASTp, plusieurs séquences protéiques pourraient faire partie d'un opéron de bactériocines. Tout d'abord, la séquence #14 était associée à une métalloprotéinase de la famille M23. Ensuite, la séquence #2 correspondait à une protéine radicale *S*-adénosylméthionine (SAM). De plus, la séquence #7 était associée à une transférase de groupement soufre. Finalement, la séquence #28 concordait avec une cytosine désaminase.

L'entérite nécrotique est un lourd problème mondial pour l'industrie mondiale de la volaille. Aux États-Unis, les pertes économiques reliées à cette maladie intestinale augmentaient de 2 à 6 milliards de dollars américains [102]. Présentement, l'entérite nécrotique est contrôlée à l'aide d'antibiotiques administrés dans la moulée des oiseaux. Avec l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et les inquiétudes du consommateur, l'industrie canadienne de la volaille a opté pour le retrait des antibiotiques à titre préventif d'importance humaine d'ici 2020 [2]. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles alternatives aux antibiotiques afin de

contrôler les cas d'entérite nécrotique, une maladie causée par la bactérie *Clostridium perfringens*. Plusieurs études à ce sujet ont déjà été réalisées proposant chacune une avenue différente à l'utilisation des antibiotiques. Parmi les alternatives suggérées, on retrouve l'utilisation de bactériophages [3, 4], l'utilisation d'huiles essentielles ou d'acides organiques [5, 6] et l'utilisation de diverses technologies de biologie moléculaire telles le système de défense bactérien CRISPR/Cas9 modifié [203]. Ces alternatives possédant toutes leurs avantages et inconvénients, aucune n'est complètement efficace. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par des bactéries dans le but de tuer ou d'inhiber la croissance de compétiteurs [7]. De tels peptides seraient de bons candidats au remplacement des antibiotiques. Cependant, peu d'information sont disponibles concernant les bactériocines de *C. perfringens*. Afin de contrôler l'entérite nécrotique en industrie avicole, il est essentiel de comprendre davantage le mécanisme et les propriétés des bactériocines de l'agent causal *Clostridium perfringens*.

Il est intéressant de constater que les souches pathogènes STF2003-1256 et SHY07-383 n'étaient pas sensibles à tous les surnageants testés, ce qui suggère que celles-ci possèdent des mécanismes d'immunité pour contrer l'activité des bactériocines. L'opéron des bactériocines est composé de gènes de synthèse, de régulation, de modification, de transport et d'immunité [121, 204]. Le fait de posséder le même opéron de bactériocines que les souches commensales pourrait expliquer l'immunité observée chez les souches pathogènes testées lors de ce projet. Les peptides antimicrobiens observés dans cette étude sont sensibles à l'activité de protéases, thermolabiles et stables à un pH entre 4 et 8. De plus, il a été estimé que le poids moléculaire de ces peptides est supérieur à 30 kDa. En considérant tous ces résultats, nous avons conclu que les bactériocines étudiées lors de ce projet appartiennent à la classe III des bactériocines qui regroupe les bactériocines de haut poids moléculaires et thermolabiles [11]. Peu d'informations sont disponibles sur cette classe de bactériocines. Les colicines, helvéticines et entérolysines produites par *Escherichia coli*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus* et *Enterococcus faecalis* sont des membres de cette classe. Sun *et al.* (2018) ont démontré que l'helvéticine-M peut perturber la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et désorganiser celle des bactéries à Gram négatif. Même si son activité est plus bactériostatique que bactéricide, il est intéressant de constater qu'une bactériocine de classe III a le potentiel d'affecter les bactéries à Gram positif et négatif [205]. Pour ce qui est du séquençage du génome de la souche

CP1676, les résultats obtenus sont semblables au séquençage du génome d'autres souches de *Clostridium perfringens* telles que les souches 13 et CBA7123 [206, 207]. De plus, les contigs analysés par l'outil BLAST correspondaient tous au microorganisme *Clostridium perfringens* avec un score d'identité élevé et des valeurs E faibles démontrant que le séquençage de la souche CP1676 s'est effectué correctement. À la suite d'analyses bio-informatiques, plusieurs protéines ayant un potentiel rôle à jouer dans un opéron de bactériocines ont été prédites. Parmi celles-ci, une métalloprotéinase de la famille M23 a été observée. Les membres de cette famille sont principalement des hydrolases de peptidoglycane [208]. Certaines bactériocines telles que la lysostaphine ont des éléments clés de la famille M23 des métalloprotéinases dans leur domaine catalytique. Ces bactériocines possèdent une activité antimicrobienne contre des staphylocoques et agissent en dégradant la paroi cellulaire [209, 210]. De plus, la lysostaphine appartient à la classe III des bactériocines. Ces caractéristiques sont similaires à celles observées dans cette étude, ce qui laisse penser que les bactériocines de la souche CP1676 pourraient être des métalloprotéinases. Ensuite, nous avons observé des séquences associées à des protéines impliquées dans la modification de peptides. En effet, les membres de la famille des protéines SAM catalysent plusieurs réactions telles que la méthylation, l'insertion d'anneau soufre et l'isomérisation. Ils sont impliqués dans la biosynthèse des vitamines, des cofacteurs, des antibiotiques et des herbicides [211]. De plus, la transférase de groupement soufre est une enzyme qui catalyse le transfert d'un atome de sulfane à une molécule réceptrice [212]. De telles enzymes ont été observées dans des opérons de bactériocines et il a été suggéré qu'elles serviraient à modifier la structure des bactériocines [213]. Finalement, nous avons aussi observé une cytosine désaminase, une enzyme qui catalyse la conversion de la cytosine en uracile [214]. Cette enzyme est chargée de convertir le pré-médicament 5-fluorocytosine (5-FC) en sa forme toxique, le 5-fluorouracile (5-FU) [215]. Plusieurs bactériocines sont synthétisées sous une forme inactive et nécessitent l'action d'une enzyme de modification pour être biologiquement actives [216]. Dans cet ordre d'idées, il pourrait être possible que la cytosine désaminase joue un rôle dans la modification de la bactériocine en sa forme mature. Étant donné que les gènes reliés aux bactériocines sont regroupés sous forme d'opéron, nous avons supposé que les séquences discutées plus haut pourraient faire partie de l'opéron des bactériocines étudiées dans cette étude.

Il est à noter que plusieurs problèmes sont survenus durant ce projet. Tout d'abord, nous nous sommes rendu compte, après plusieurs essais de chromatographie, que le HPLC (ÄKTA purifier, GE Healthcare) que nous utilisions était défectueux. En effet, le responsable de cet appareil nous a signalé qu'il y avait un problème lors de l'ouverture de l'appareil au niveau du système de détection par rayons UV et que la détection des protéines ne s'effectuait pas adéquatement. Lors d'une évaluation par un technicien formé dans le domaine, celui-ci nous a indiqué que les sources possibles du problème étaient la lampe UV ou le monochromateur du système UV. Ces deux dispositifs sont essentiels pour la détection de protéines et sont très dispendieux, c'est pourquoi il n'a pas été possible de purifier davantage les bactériocines observées dans cette étude. La détection des protéines d'un mélange est donc affectée par les bris de l'appareil, cependant nous avons tout de même réussi à détecter l'activité antimicrobienne des bactériocines dans les fractions récoltées par HPLC et ce même si la détection protéique n'était pas optimale. Ensuite, nous avons eu beaucoup de difficulté à trouver un autre système de HPLC, puisque tous les systèmes de chromatographie de la faculté de médecine vétérinaire similaires à celui utilisé lors de mon projet étaient hors d'usage ou indisponibles. Pour régler ce problème, nous avons contacté la plateforme de bioanalyse de l'Université de Sherbrooke afin de réaliser les analyses au HPLC pour nous. Le Dr Lounes Haroune reproduira la séparation protéique du surnageant bactérien par HPLC à l'aide de colonnes de chromatographie permettant une résolution optimale (même type de colonne que j'ai utilisé, mais celles du Dr Haroune peuvent subir une pression beaucoup plus grande permettant d'obtenir des fractions plus pures, soit des fractions contenant une ou deux protéines). Ainsi, il nous sera possible de confirmer les résultats obtenus lors de nos essais de séparation au HPLC, mais nous pourrons aussi purifier davantage les bactériocines observées dans cette étude au besoin. Par exemple, il serait possible d'effectuer une seconde chromatographie en utilisant un paramètre de séparation différent de la première (hydrophobicité au lieu de la charge protéique). De plus, il était très difficile de visualiser les protéines du gel SDS-PAGE en utilisant une technique de coloration standard (bleu de Coomassie). Il a donc été nécessaire de tester différentes techniques de coloration afin de trouver celle qui permettait de bien visualiser les bandes. Nous avons donc utilisé une coloration au SYPRO™ Ruby qui permet une détection par fluorescence d'une quantité beaucoup plus faible de protéines comparativement au bleu de Coomassie. De plus, si la purification des bactériocines

par HPLC avait été effectuée complètement, une analyse par spectrométrie de masse aurait permis de déterminer leur poids moléculaire réel ainsi que leur séquence protéique. Après avoir obtenu cette information, il aurait été possible de localiser la position des gènes des bactériocines découvertes dans le génome de la souche CP1676. Ainsi, nous aurions pu caractériser l'opéron de ces bactériocines et déterminer s'ils sont présents sur le chromosome bactérien ou sur un plasmide. De plus, il serait intéressant de cloner les opérons dans un microorganisme dont les conditions de croissance ne sont pas fastidieuses telles qu'*Escherichia coli*. De cette façon, il serait aisé de produire les bactériocines d'intérêt en grande quantité et de développer un produit antimicrobien à base de bactériocines. Il est connu que les résultats observés en laboratoire ne concordent pas toujours à ceux observés sur le terrain, et ce pour diverses raisons. Dans le cadre de ce projet, il aurait donc été intéressant de tester la sensibilité à d'autres températures ou à un intervalle de pH plus élargi. Par exemple, évaluer la stabilité des bactériocines en conditions qui simulent l'environnement gastro-intestinal *in vivo* afin d'anticiper le comportement de ces bactériocines serait nécessaire. De plus, il serait intéressant de penser aux méthodes d'administration des bactériocines à la volaille. Nous croyons qu'il serait préférable d'administrer les bactériocines seules ou dans un mélange contenant plusieurs bactériocines via l'alimentation des oiseaux afin que celles-ci puissent agir directement contre *C. perfringens* dans le tractus intestinal. À ce sujet, il serait essentiel de n'administrer que les bactériocines purifiées dans l'alimentation et non pas les bactéries productrices. En effet, il a été reporté que les bactéries peuvent effectuer des transferts horizontaux de gènes de résistance [217]. Le transfert aux bactéries pathogènes intestinales du gène d'immunité présent dans l'opéron de la bactériocine rendrait le processus inefficace et nous serions de retour avec un problème de résistance. Finalement, étant capables de prédire le comportement des bactériocines *in vivo* tout en évitant un second problème de résistance antimicrobienne, nous serions en mesure de développer des technologies permettant la protection et le transport des bactériocines à leur cible sous des conditions défavorables. Diverses technologies de microencapsulation permettant de protéger les bactériocines des conditions environnementales hostiles ont été proposées telles que l'enrobage par film de polysaccharides, l'incorporation dans des liposomes, l'enrobage dans des nanofibres et l'incorporation dans des nanoparticules de différentes natures (argent, or, phytoglycogène) [218].

En conclusion, de nouvelles bactériocines d'une souche commensale de *C. perfringens* ont été purifiées et caractérisées. Les peptides antimicrobiens ont un poids moléculaire supérieur à 30 kDa et sont thermolabiles. Nous avons donc conclu que les bactériocines étudiées dans ce projet appartiennent à la classe III des bactériocines. En utilisant des outils bio-informatiques, nous avons aussi trouvé des séquences protéiques associées à une métalloprotéinase et à des enzymes de modification pouvant faire partie d'un opéron de bactériocines. Il serait important d'obtenir davantage de données sur les bactériocines de *Clostridium perfringens* puisque de nouvelles alternatives sont nécessaires pour contrôler l'entérite nécrotique.

## Conclusion

La résistance aux antibiotiques est une problématique actuelle qui nécessite d'être prise en main. Au cœur de cette problématique, tous ont un rôle à jouer afin de réduire l'utilisation d'antibiotiques. Plusieurs alternatives ont déjà été proposées afin d'enrayer le problème, cependant aucune d'entre elles n'est totalement efficace. Les bactériocines figurent parmi les potentiels remplaçants des antibiotiques, mais un manque d'information à ce sujet, particulièrement concernant les bactériocines de *Clostridium perfringens*, représente un obstacle significatif à leur utilisation.

Les objectifs de ce projet étaient d'identifier des souches commensales de *C. perfringens* ayant une activité antimicrobienne contre des souches pathogènes de *C. perfringens*, puis d'isoler et de caractériser les bactériocines produites par ces souches commensales afin d'approfondir les connaissances à ce sujet. L'utilisation de souches commensales n'étant pas porteuses du gène de la perfrine a été nécessaire afin de s'assurer d'identifier et de caractériser de nouvelles bactériocines de *C. perfringens*. Ainsi, après la sélection de souches commensales possédant une activité antimicrobienne contre des souches pathogènes de *C. perfringens*, les bactériocines d'une de ces souches ont été produites, purifiées et caractérisées. Nous avons déterminé que les bactériocines observées dans cette étude sont de haut poids moléculaire, sensibles à la chaleur et à l'activité des protéases et stables à un pH variant entre 4 et 8. De plus, le séquençage et l'analyse bio-informatique du génome de la souche commensale ont permis de trouver plusieurs séquences protéiques pouvant correspondre à des gènes retrouvés dans un opéron de bactériocines.

Cette étude a permis d'approfondir les connaissances concernant les bactériocines de *Clostridium perfringens*, l'agent causal de l'entérite nécrotique. Cependant, il serait d'important d'acquérir davantage de données sur les facteurs affectant la production de ces bactériocines ainsi que leur fonctionnement. Par exemple, il serait intéressant de déterminer la stabilité des bactériocines sous des conditions simulant l'environnement gastro-intestinal des oiseaux afin d'anticiper une dénaturation des peptides antimicrobiens. De plus, il serait intéressant de

produire ces bactériocines en grande quantité, puis d'utiliser une technologie de microencapsulation afin de s'assurer que celles-ci ne soient pas dégradées dans le tractus digestif. Finalement, il serait pertinent de détecter la présence des opérons de bactériocines à travers une banque de souches de *Clostridium perfringens* afin de déterminer si ces peptides antimicrobiens sont produits aussi chez des souches pathogènes.

## Bibliographie

1. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Causes of Antimicrobial (Drugs) Resistance: 2019 [Repéré le 19 août 2019]. Disponible: <https://www.niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes>
2. Les Producteurs de poulet du Canada. Antibiotiques: 2019 [Repéré le 19 août 2019]. Disponible: <https://www.producteursdepoulet.ca/les-antibiotiques/>
3. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2017;8(3):162-73.
4. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe.* 2019;25(2):219-32.
5. Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim Nutr.* 2018;4(2):126-36.
6. Dittoe DK, Ricke SC, Kiess AS. Organic Acids and Potential for Modifying the Avian Gastrointestinal Tract and Reducing Pathogens and Disease. *Front Vet Sci.* 2018;5:216.
7. Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front Microbiol.* 2018;9:594.
8. Lee H, Kim HY. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol.* 2011;21(3):229-35.
9. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb Pathog.* 2019;128:171-7.
10. Timbermont L, De Smet L, Van Nieuwerburgh F, Parreira VR, Van Driessche G, Haesebrouck F, et al. Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Vet Res.* 2014;45:40.
11. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014;5:241.

12. Wells CL, Wilkins TD. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. Galveston (TX)1996.
13. Durre P. Physiology and Sporulation in Clostridium. Microbiol Spectr. 2014;2(4).
14. Tracy BP, Jones SW, Fast AG, Indurthi DC, Papoutsakis ET. Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. Curr Opin Biotechnol. 2012;23(3):364-81.
15. Udaondo Z, Duque E, Ramos JL. The pangenome of the genus Clostridium. Environ Microbiol. 2017;19(7):2588-603.
16. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. Front Vet Sci. 2017;4:126.
17. 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 Pathog Dis. 2013;10(7):639-48.
18. Grass JE, Gould LH, Mahon BE. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. Foodborne Pathog Dis. 2013;10(2):131-6.
19. Ribis JW, Ravichandran P, Putnam EE, Pishdadian K, Shen A. The Conserved Spore Coat Protein SpoVM Is Largely Dispensable in Clostridium difficile Spore Formation. mSphere. 2017;2(5).
20. Li J, Paredes-Sabja D, Sarker MR, McClane BA. *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. Microbiol Spectr. 2016;4(3).
21. Viana Brandi I, Domenici Mozzer O, Jorge EV, Vieira Passos FJ, Lopes Passos FM, Cangussu AS, et al. Growth conditions of *Clostridium perfringens* type B for production of toxins used to obtain veterinary vaccines. Bioprocess Biosyst Eng. 2014;37(9):1737-42.
22. Taormina PJ, Dorsa WJ. Growth potential of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked meats. J Food Prot. 2004;67(7):1537-47.
23. Smith S, Schaffner DW. Evaluation of a *Clostridium perfringens* predictive model, developed under isothermal conditions in broth, to predict growth in ground beef during cooling. Appl Environ Microbiol. 2004;70(5):2728-33.
24. Fernandez-Miyakawa ME, Marcellino R, Uzal FA. *Clostridium perfringens* type A toxin production in 3 commonly used culture media. J Vet Diagn Invest. 2007;19(2):184-6.

25. Harmon SM, Kautter DA, Peeler JT. Comparison of media for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol.* 1971;21(5):922-7.
26. Hauschild AH, Hilsheimer R. Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol.* 1974;27(1):78-82.
27. Clooten JK, Kruth SA, Weese JS. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 2003;17(2):123; author reply
28. Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe.* 2018;53:5-10.
29. Kiu R, Hall LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):141.
30. Badagliacca P, Di Provvido A, Scattolini S, Pompei G, Di Giannatale E. Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* strains using a polymerase chain reaction protocol. *Vet Ital.* 2010;46(1):113-8, 07-12.
31. Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 1999;7(3):104-10.
32. Shojadoost B, Vince AR, Prescott JF. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Vet Res.* 2012;43:74.
33. To H, Suzuki T, Kawahara F, Uetsuka K, Nagai S, Nunoya T. Experimental induction of necrotic enteritis in chickens by a netB-positive Japanese isolate of *Clostridium perfringens*. *J Vet Med Sci.* 2017;79(2):350-8.
34. Oda M, Terao Y, Sakurai J, Nagahama M. Membrane-Binding Mechanism of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. *Toxins (Basel).* 2015;7(12):5268-75.
35. Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu Rev Microbiol.* 1998;52:333-60.
36. Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, Gurjar AA. *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxinology J.* 2010;2:24-42.
37. Takagishi T, Takehara M, Seike S, Miyamoto K, Kobayashi K, Nagahama M. *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin impairs erythropoiesis by inhibition of erythroid differentiation. *SCIENTIFIC REPORTS.* 2017;7:1-11.

38. Nagahama M, Ochi S, Oda M, Miyamoto K, Takehara M, Kobayashi K. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins (Basel)*. 2015;7(2):396-406.
39. Alves GG, Machado de Avila RA, Chavez-Olortegui CD, Lobato FC. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*. 2014;30:102-7.
40. Takehara M, Takagishi T, Seike S, Oda M, Sakaguchi Y, Hisatsune J, et al. Cellular Entry of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin and *Clostridium botulinum* C2 Toxin. *Toxins (Basel)*. 2017;9(8).
41. Redondo LM, Carrasco JM, Redondo EA, Delgado F, Miyakawa ME. *Clostridium perfringens* type E virulence traits involved in gut colonization. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121305.
42. Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*. 1997;203(1):65-73.
43. Gurjar A, Li J, McClane BA. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. *Infect Immun*. 2010;78(11):4860-9.
44. Elsifi AM. A review on *Clostridium perfringens* toxins with special reference to Beta 2 toxin. *Minufiya Vet J*. 2015;9:85-100.
45. Schotte U, Truyen U, Neubauer H. Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors--a review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004;51(10):423-6.
46. Li J, Adams V, Bannam TL, Miyamoto K, Garcia JP, Uzal FA, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(2):208-33.
47. Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins (Basel)*. 2016;8(3).
48. Shrestha A, Uzal FA, McClane BA. The interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with receptor claudins. *Anaerobe*. 2016;41:18-26.
49. Veshnyakova A, Piontek J, Protze J, Waziri N, Heise I, Krause G. Mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J Biol Chem*. 2012;287(3):1698-708.
50. Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*. 2002;38(10):713-21.

51. Kawahara K, Yonogi S, Munetomo R, Oki H, Yoshida T, Kumeda Y, et al. Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;480(2):261-7.
52. Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, et al. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect Immun*. 2014;82(6):2390-9.
53. Johnson BB, Heuck AP. Perfringolysin O structure and mechanism of pore formation as a paradigm for cholesterol-dependent cytolysins. *Subcell Biochem*. 2014;80:63-81.
54. Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, Pardon B, Timbermont L, Haesebrouck F, et al. Perfringolysin O: The Underrated *Clostridium perfringens* Toxin? *Toxins (Basel)*. 2015;7(5):1702-21.
55. Jones S, Portnoy DA. Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect Immun*. 1994;62(12):5608-13.
56. O'Brien DK, Melville SB. The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions. *Cell Microbiol*. 2000;2(6):505-19.
57. O'Brien DK, Melville SB. Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. *Infect Immun*. 2004;72(9):5204-15.
58. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e26.
59. Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol*. 2014;9(3):361-77.
60. Bannam TL, Yan XX, Harrison PF, Seemann T, Keyburn AL, Stubenrauch C, et al. Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *MBio*. 2011;2(5).

61. Cheung JK, Keyburn AL, Carter GP, Lanckriet AL, Van Immerseel F, Moore RJ, et al. The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*. 2010;78(7):3064-72.
62. Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, Nicholson VM, Oliphant K, Prescott JF. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122684.
63. Revitt-Mills AA, Rood JI, Adams V. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiology Australia*. 2015:114-7.
64. Chen J, McClane BA. Characterization of *Clostridium perfringens* TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. *Infect Immun*. 2015;83(6):2369-81.
65. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 2005;18:247-63.
66. Schorch B, Song S, van Diemen FR, Bock HH, May P, Herz J, et al. LRP1 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):6431-6.
67. Nagahama M, Ohkubo A, Oda M, Kobayashi K, Amimoto K, Miyamoto K, et al. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. *Infect Immun*. 2011;79(2):905-10.
68. Guttenberg G, Hornei S, Jank T, Schwan C, Lu W, Einsle O, 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):24929-40.
69. Seike S, Miyamoto K, Kobayashi K, Takehara M, Nagahama M. *Clostridium perfringens* Delta-Toxin Induces Rapid Cell Necrosis. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147957.
70. Manich M, Knapp O, Gibert M, Maier E, Jolivet-Reynaud C, Geny B, 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):e3764.
71. Kolter T. Ganglioside biochemistry. *ISRN Biochem*. 2012;2012:506160.
72. Huyet J, Naylor CE, Savva CG, Gibert M, Popoff MR, Basak AK. Structural Insights into *Clostridium perfringens* Delta Toxin Pore Formation. *PLoS One*. 2013;8(6):e66673.

73. McDonel JL. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacol Ther.* 1980;10(3):617-55.
74. Awad MM, Ellemor DM, Bryant AE, Matsushita O, Boyd RL, Stevens DL, et al. Construction and virulence testing of a collagenase mutant of *Clostridium perfringens*. *Microb Pathog.* 2000;28(2):107-17.
75. Kameyama S, Akama K. PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF KAPPA TOXIN OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*. *Japan J Med Sci Biol.* 1971;24:9-23.
76. Jin F, Matsushita O, Katayama S, Jin S, Matsushita C, Minami J, et al. Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. *Infect Immun.* 1996;64(1):230-7.
77. Minami J, Katayama S, Matsushita O, Matsushita C, Okabe A. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol Immunol.* 1997;41(7):527-35.
78. Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006;106(3):818-39.
79. Chitayat S, Adams JJ, Furness HS, Bayer EA, Smith SP. 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):1202-12.
80. Adams JJ, Gregg K, Bayer EA, Boraston AB, Smith SP. Structural basis of *Clostridium perfringens* toxin complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(34):12194-9.
81. Okumura K, Kawsar HI, Shimizu T, Ohta T, Hayashi H, Shimizu T. Identification and characterization of a cell-wall anchored DNase gene in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;242(2):281-5.
82. Robb-Smith AHT. Tissue Changes induced by CL welchii Type A Filtrates. *Lancet.* 1945;ii:362-8.
83. Juge N, Tailford L, Owen CD. Sialidases from gut bacteria: a mini-review. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(1):166-75.
84. Llanco LA, Nakano V, Avila-Campos MJ. Sialidase production and genetic diversity in *Clostridium perfringens* type A isolated from chicken with necrotic enteritis in Brazil. *Curr Microbiol.* 2015;70(3):330-7.

85. Hiscox TJ, Harrison PF, Chakravorty A, Choo JM, Ohtani K, Shimizu T, et al. Regulation of sialidase production in *Clostridium perfringens* by the orphan sensor histidine kinase ReeS. PLoS One. 2013;8(9):e73525.
86. Hiscox TJ, Chakravorty A, Choo JM, Ohtani K, Shimizu T, Cheung JK, et al. Regulation of virulence by the RevR response regulator in *Clostridium perfringens*. Infect Immun. 2011;79(6):2145-53.
87. Li J, Ma M, Sarker MR, McClane BA. CodY is a global regulator of virulence-associated properties for *Clostridium perfringens* type D strain CN3718. MBio. 2013;4(5):e00770-13.
88. Chiarezza M, Lyras D, Pidot SJ, Flores-Diaz M, Awad MM, Kennedy CL, et al. The NanI and NanJ Sialidases of *Clostridium perfringens* Are Not Essential for Virulence. INFECTION AND IMMUNITY. 2009;77:4421-8.
89. Li J, Uzal FA, McClane BA. *Clostridium perfringens* Sialidases: Potential Contributors to Intestinal Pathogenesis and Therapeutic Targets. Toxins (Basel). 2016;8(11).
90. Li J, Sayeed S, Robertson S, Chen J, McClane BA. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718. PLoS Pathog. 2011;7(12):e1002429.
91. Kiu R, Caim S, Alexander S, Pachori P, Hall LJ. Probing Genomic Aspects of the Multi-Host Pathogen *Clostridium perfringens* Reveals Significant Pangenome Diversity, and a Diverse Array of Virulence Factors. Front Microbiol. 2017;8:2485.
92. Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol Rev. 1991;55(4):621-48.
93. Stevens DL, Bryant AE. The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. Clin Infect Dis. 2002;35(Suppl 1):S93-S100.
94. Kiu R, Hall LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerging microbes & infections. 2018;7(1):141-.
95. MacLennan JD. The histotoxic clostridial infections of man. Bacteriol Rev. 1962;26:177-276.
96. Titball RW. Gas gangrene: an open and closed case. Microbiology. 2005;151(Pt 9):2821-8.
97. Brynstad S, Granum PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. Int J Food Microbiol. 2002;74(3):195-202.

98. 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.
99. Huang IH, Waters M, Grau RR, Sarker MR. Disruption of the gene (spo0A) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;233(2):233-40.
100. Doyle MP, Buchanan RL. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.* 4<sup>th</sup> ed 2012.
101. Uzal FA, McClane BA. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Vet Microbiol.* 2011;153(1-2):37-43.
102. Wade B, Keyburn A. The true cost of necrotic enteritis. *World Poult.* 2015;31:16-7.
103. Zahoor I, Ghayas A, Basheer A. Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: a review. *Mol Biol Rep.* 2018;45(1):31-7.
104. Prescott JF, Parreira VR, Mehdizadeh Gohari I, Lepp D, Gong J. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. *Avian Pathol.* 2016;45(3):288-94.
105. Wade B, Keyburn AL, Haring V, Ford M, Rood JI, Moore RJ. The adherent abilities of *Clostridium perfringens* strains are critical for the pathogenesis of avian necrotic enteritis. *Vet Microbiol.* 2016;197:53-61.
106. M'Sadeq SA, Wu S, Swick RA, Choct M. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Animal Nutrition.* 2015;1:1-11.
107. Oh ST, Lillehoj HS. The role of host genetic factors and host immunity in necrotic enteritis. *Avian Pathol.* 2016;45(3):313-6.
108. Castanon JI. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science.* 2007;86(11):2466-71.
109. Diarra MS, Malouin F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in microbiology.* 2014;5:282-.
110. Riaz A, Umar S, Tanveer Munir M, Tariq M. Replacements of Antibiotics in the Control of Necrotic Enteritis: A Review. *Sci Lett.* 2017;5:208-16.

111. Canada. Gd. Utilisation responsable des antimicrobiens importants sur le plan médical chez les animaux: 2018 [Repéré le 12 novembre 2019]. Disponible: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/resistance-aux-antibiotiques-antimicrobiens/animaux/actes/utilisation-responsable-antimicrobiens.html>
112. Caly DL, D'Inca R, Auclair E, Drider D. Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist's Perspective. *Front Microbiol.* 2015;6:1336.
113. Nishie M, Nagao J, Sonomoto K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 2012;17(1):1-16.
114. Oscariz JC, Pisabarro AG. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int Microbiol.* 2001;4(1):13-9.
115. Santos VL, Nardi Drummond RM, Dias-Souza MV. Bacteriocins as Antimicrobial and Antibiofilm Agents. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.* 2017:403-36.
116. Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio.* 2018;9(3).
117. Dicks LMT, Dreyer L, Smith C, van Staden AD. A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut-Blood Barrier? *Front Microbiol.* 2018;9:2297.
118. Ghequire MGK, De Mot R. The Tailocin Tale: Peeling off Phage Tails. *Trends Microbiol.* 2015;23(10):587-90.
119. Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009;10(1):2-18.
120. Rebuffat S. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(6):1456-62.
121. Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules.* 2017;22(8).
122. Heng N, Wescombe P, Burton J, Jack R, Tagg J. The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. *Bacteriocins, Ecology and Evolution.* 2006:45-92.
123. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep.* 2013;30(1):108-60.

124. Alvarez-Sieiro P, Montalban-Lopez M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(7):2939-51.
125. Zendo T. Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(5):893-9.
126. Kamarajan P, Hayami T, Matte B, Liu Y, Danciu T, Ramamoorthy A, et al. Nisin ZP, a Bacteriocin and Food Preservative, Inhibits Head and Neck Cancer Tumorigenesis and Prolongs Survival. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131008.
127. Umu OC, Bauerl C, Oostindjer M, Pope PB, Hernandez PE, Perez-Martinez G, et al. The Potential of Class II Bacteriocins to Modify Gut Microbiota to Improve Host Health. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164036.
128. Ditu L-M, Chifiriuc MC, Pelinescu D, Avram I, Pircalabioru G, Mihaescu G. Class I and II Bacteriocins: Structure, Biosynthesis and Drug Delivery Systems for the Improvement of their Antimicrobial Activity *Current Proteomics*. 2014;11:1-7.
129. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006:1-12.
130. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(2):95-105.
131. Parks WM, Bottrill AR, Pierrat OA, Durrant MC, Maxwell A. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*. 2007;89(4):500-7.
132. Bagley MC, Dale JW, Merritt EA, Xiong X. Thiopeptide antibiotics. *Chem Rev*. 2005;105(2):685-714.
133. Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H, Nes IF. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2384-9.
134. Manolaridis I, Kulkarni K, Dodd RB, Ogasawara S, Zhang Z, Bineva G, et al. Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1. *Nature*. 2013;504(7479):301-5.
135. Kjos M, Salehian Z, Nes IF, Diep DB. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J Bacteriol*. 2010;192(22):5906-13.

136. Kjos M, Borrero J, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, et al. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*. 2011;157(Pt 12):3256-67.
137. Dorit SMRRL. *Bacteriocins*: Caister Academic Press; 2016.
138. Field D, Cotter P, Hill C, Ross RP. Chapter 2 - Bacteriocin biosynthesis, structure and function. *Research and Applications in Bacteriocins*. 2007.
139. Lafuente-Rincón DF, Chávez Velásquez TE, De la Fuente-Salcido NM. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: Features and biotherapeutic approach african *Journal of Microbiology Research*. 2016:1873-9.
140. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*. 2004;25(9):1405-14.
141. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, De Vos WM. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. *Eur J Biochem*. 1993;216(1):281-91.
142. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, Luesink EJ, de Vos WM. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27299-304.
143. Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;49:23-8.
144. Field D, Begley M, O'Connor PM, Daly KM, Hugenholtz F, Cotter PD, et al. Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and Gram negative pathogens. *PLoS One*. 2012;7(10):e46884.
145. O'Shea EF, O'Connor PM, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Synthesis of trypsin-resistant variants of the *Listeria*-active bacteriocin salivaricin P. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(16):5356-62.
146. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;81(4):591-606.
147. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(1):1-6.
148. Corr SC, Hill C, Gahan CG. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv Food Nutr Res*. 2009;56:1-15.

149. Claesson MJ, Li Y, Leahy S, Canchaya C, van Pijkeren JP, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6718-23.
150. Schamberger GP, Diez-Gonzalez F. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Food Prot*. 2004;67(3):486-92.
151. Felicio BA, Pinto MS, Oliveira FS, Lempk MW, Pires AC, Lelis CA. Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. *Journal of dairy science*. 2015;98(7):4364-9.
152. Hampikyan H. Efficacy of nisin against *Staphylococcus aureus* in experimentally contaminated sucuk, a Turkish-type fermented sausage. *J Food Prot*. 2009;72(8):1739-43.
153. Siroli L, Camprini L, Pisano MB, Patrignani F, Lanciotti R. Volatile Molecule Profiles and Anti-*Listeria monocytogenes* Activity of Nisin Producers *Lactococcus lactis* Strains in Vegetable Drinks. 2019;10(563).
154. Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2018;4:9.
155. Saising J, Dube L, Ziebandt AK, Voravuthikunchai SP, Nega M, Gotz F. Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5804-10.
156. Todorov SD, Wachsman M, Tome E, Dousset X, Destro MT, Dicks LM, et al. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiol*. 2010;27(7):869-79.
157. Quintana VM, Torres NI, Wachsman MB, Sinko PJ, Castilla V, Chikindas M. Antiherpes simplex virus type 2 activity of the antimicrobial peptide subtilosin. *J Appl Microbiol*. 2014;117(5):1253-9.
158. Wachsman MB, Castilla V, de Ruiz Holgado AP, de Torres RA, Sesma F, Coto CE. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Res*. 2003;58(1):17-24.
159. Ferir G, Petrova MI, Andrei G, Huskens D, Hoorelbeke B, Snoeck R, et al. The lantibiotic peptide labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications. *PLoS One*. 2013;8(5):e64010.

160. World Health Organization. Cancer: 2019 [Repéré le 19 août 2019]. Disponible: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
161. National Cancer Institute. Types of Cancer Treatments: 2019 [Repéré le 19 août 2019]. Disponible: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
162. Joo NE, Ritchie K, Kamarajan P, Miao D, Kapila YL. Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Med.* 2012;1(3):295-305.
163. Chen B, Le W, Wang Y, Li Z, Wang D, Ren L, et al. Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoprobes. *Theranostics.* 2016;6(11):1887-98.
164. Baindara P, Korpole S, Grover V. Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(24):10393-408.
165. Tsumori H, Shimizu Y, Nagatoshi K, Sakurai Y, Yamakami K. Prospects for Liposome-Encapsulated Nisin in the Prevention of Dental Caries. *Interface Oral Health Science.* 2014.
166. Higa A, Yoshida E, Miyoshi Y. Characterization of Two Bacteriocins Produced by *Clostridium perfringens*. *Microbiology and Immunology.* 1991;35(6):411-21.
167. Wolff A, Ionesco H. [Purification and characterization of "*Clostridium perfringens*" BP6K-N5 strain bacteriocin N5 (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris).* 1975;126(3):343-56.
168. Mahony DE, Li A. Comparative study of ten bacteriocins of *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;14(6):886-92.
169. Li AW, Verpoorte JA, Lewis RG, Mahony DE. Characterization of bacteriocin 28 produced by *Clostridium perfringens*. *Can J Microbiol.* 1982;28(7):860-73.
170. Miyamoto K, Seike S, Takagishi T, Okui K, Oda M, Takehara M, et al. Identification of the replication region in pBCNF5603, a bacteriocin-encoding plasmid, in the enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strain F5603. *BMC Microbiology.* 2015;15(1):118.
171. Garnier T, Cole ST. Characterization of a bacteriocinogenic plasmid from *Clostridium perfringens* and molecular genetic analysis of the bacteriocin-encoding gene. *J Bacteriol.* 1986;168(3):1189-96.
172. Stretton AO. The first sequence. Fred Sanger and insulin. *Genetics.* 2002;162(2):527-32.
173. Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, et al. Structure of a Ribonucleic Acid. *Science.* 1965;147(3664):1462-5.

174. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1-8.
175. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*. 2005;15(12):1767-76.
176. Eisen JA. Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS Biol*. 2007;5(3):e82.
177. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
178. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001;11(1):3-11.
179. Siqueira JF, Jr., Fouad AF, Rocas IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*. 2012;4.
180. Ramon D, Braden M, Adams S, Marincola FM, Wang L. Pyrosequencing trade mark : A one-step method for high resolution HLA typing. *J Transl Med*. 2003;1(1):9.
181. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-52.
182. Kchouk M, Gibrat J-F, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*. 2017.
183. Illumina. History of sequencing by synthesis: 2019 [Repéré le 29 août 2019]. Disponible: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/illumina-sequencing-history.html>
184. Heo Y. Improving quality of high-throughput sequencing reads 2015.
185. Ari S, Arikan M. Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. *Plant Omics-Trends and Applications*. 2016.
186. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(16):e105.
187. Kircher M, Kelso J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays*. 2010;32(6):524-36.
188. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017;550(7676):345-53.

189. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* 2018;34(9):666-81.
190. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.
191. Derocles S, Bohan D, Dumbrell A, Kitson J, Massol F, Pauvert C, et al. Biomonitoring for the 21st Century: Integrating Next-Generation Sequencing Into Ecological Network Analysis. *Advances in Ecological Research.* 2018;58:1-62.
192. National Center for Biotechnology Information. GenBank and WGS Statistics: S.D. [Repéré le 14 août 2019]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>
193. Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? An introduction and overview. *Yearb Med Inform.* 2001(1):83-99.
194. Pevsner J. *Bioinformatics and Functional Genomics.* Wiley Blackwell. 2015.
195. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:119.
196. Lomsadze A, Gemayel K, Tang S, Borodovsky M. Modeling leaderless transcription and atypical genes results in more accurate gene prediction in prokaryotes. *Genome Res.* 2018;28(7):1079-89.
197. omicX. Prodigal: 2019 [Repéré le 17 novembre 2019]. Disponible: <https://omictools.com/prodigal-tool>
198. Hamid MN, Friedberg I. Identifying antimicrobial peptides using word embedding with deep recurrent neural networks. *Bioinformatics.* 2019;35(12):2009-16.
199. GitHub. NeuBI: 2019 [Repéré le 17 novembre 2019]. Disponible: <https://github.com/nafizh/NeuBI>
200. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W5-9.
201. Wheeler D, Bhagwat M. BLAST QuickStart: Example-Driven Web-Based BLAST Tutorial. *Comparative Genomics.* 2007;Volumes 1 and 2.
202. Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W29-33.

203. Kim JS, Cho DH, Park M, Chung WJ, Shin D, Ko KS, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Harboring Extended-Spectrum beta-Lactamases. *J Microbiol Biotechnol.* 2016;26(2):394-401.
204. Ishibashi N, Himeno K, Masuda Y, Perez RH, Iwatani S, Zendo T, et al. Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(21):6647-55.
205. Sun Z, Wang X, Zhang X, Wu H, Zou Y, Li P, et al. Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2018;45(3):213-27.
206. Kim YB, Kim JY, Song HS, Lee C, Kwon J, Kang J, et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens* CBA7123 isolated from a faecal sample from Korea. *Gut Pathog.* 2017;9:32-.
207. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):996-1001.
208. Grabowska M, Jagielska E, Czapinska H, Bochtler M, Sabala I. High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue. *Scientific Reports.* 2015;5:14833.
209. Bastos MdCdF, Coutinho BG, Coelho MLV. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals.* 2010;3(4).
210. Sabala I, Jagielska E, Bardelang PT, Czapinska H, Dahms SO, Sharpe JA, et al. Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. *FEBS J.* 2014;281(18):4112-22.
211. Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, Miller NE. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic acids research.* 2001;29(5):1097-106.
212. Papenbrock J, Schmidt A. Characterization of a sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry.* 2000;267(1):145-54.
213. Holmes NA, Innocent TM, Heine D, Bassam MA, Worsley SF, Trottmann F, et al. Genome Analysis of Two *Pseudonocardia* Phylotypes Associated with *Acromyrmex* Leafcutter Ants Reveals Their Biosynthetic Potential. *Frontiers in microbiology.* 2016;7:2073-.

214. Minton NP, Ehsaan M, Humphreys CM, Little GT, Baker J, Henstra AM, et al. A roadmap for gene system development in *Clostridium*. *Anaerobe*. 2016;41:104-12.
215. Ichikawa T, Tamiya T, Adachi Y, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, et al. In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(1):74-82.
216. And HC, Hoover DG. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003;2(3):82-100.
217. Lermniaux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*. 2019;65(1):34-44.
218. Chandrakasan G, Rodriguez-Hernandez AI, Del Rocio Lopez-Cuellar M, Palma-Rodriguez HM, Chavarria-Hernandez N. Bacteriocin encapsulation for food and pharmaceutical applications: advances in the past 20 years. *Biotechnology letters*. 2019;41(4-5):453-69.