

Université de Montréal

Utilisation de la vaccinologie réverse pour l'identification de protéines candidates vaccinales
chez *Clostridium perfringens* causant l'entérite nécrotique aviaire

Par

Ilhem Meniaï

Département de pathologie et microbiologie

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 hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Avril 2020

© Ilhem Meniaï, 2020

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Utilisation de la vaccinologie réverse pour l'identification de protéines candidates vaccinales chez *Clostridium perfringens* causant l'entérite nécrotique aviaire

Présenté par

Ilhem Meniaï

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Pablo Godoy

Président-rapporteur

Marie-Lou Gaucher

Directrice de recherche

Alexandre Thibodeau

Codirecteur

Sylvain Quessy

Codirecteur

Christopher Fernández Prada

Membre du jury

Résumé

L'entérite nécrotique aviaire causée par *Clostridium perfringens* est une maladie économiquement dévastatrice et celle-ci est en émergence dans les troupeaux de poulets de chair éliminant l'usage des antibiotiques. À ce jour, aucune alternative en élevage ne permet de prévenir efficacement la maladie et un contrôle par une stratégie vaccinale serait des plus prisé. Une approche par génomique comparative jumelée à la vaccinologie réverse soustractive et comparative identifiant des protéines bactériennes de surface immunogènes figure parmi les approches méthodologiques des plus prometteuses pour le développement rapide d'un vaccin efficace.

Une étude génomique comparative réalisée sur 48 souches de *C. perfringens* provenant de poulets de chair en santé ou affectés par l'entérite nécrotique a permis d'établir que les génomes analysés étaient composés de 155 700 protéines distinctes, où 13% étaient extracellulaires, 65% cytoplasmiques et 22% membranaires. L'évaluation du pouvoir immunogène de ces protéines à l'aide de l'outil de prédiction VaxiJen v.2.0 a permis d'identifier 4 catégories de scores pour les protéines identifiées, allant de 0,5 (seuil minimal recommandé) à 1,5. Les protéines présentant les scores les plus élevés ont été majoritairement associées à des localisations extracellulaires. La combinaison du score d'immunogénicité et de la localisation cellulaire des protéines analysées a mené à la sélection de 12 protéines candidates vaccinales, la plupart d'entre elles étant de fonction hypothétique. Une description plus approfondie de ces protéines permettra de mieux définir leur fonction, d'évaluer leur potentiel antigénique réel en caractérisant leur interaction avec le système immunitaire de la volaille et ultimement, d'évaluer leur rôle probable dans la pathogénie de l'entérite nécrotique.

Mots-clés : Poulets de chair, entérite nécrotique, *Clostridium perfringens*, vaccinologie réverse, protéines candidates, vaccin.

Abstract

Avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* is a disease with a major economical impact, generating losses up to 6 billion dollars for the poultry industry worldwide. This disease appears in broiler chicken flocks that no longer employ the use of antibiotics. To date, no alternative method allows for the efficient prevention of necrotic enteritis (NE) and a control by a vaccinal strategy would be mostly prized. A comparative genomics approach as well as comparative and subtractive reverse vaccinology identifying immunogenic bacterial surface proteins is one of the most promising methodologies for the rapid development of an efficient vaccine. A comparative genomic study was performed on 48 *C. perfringens* strains isolated from healthy broiler chickens and from broilers affected by necrotic enteritis. From this study, it was established that the genomes analyzed were composed of 155 700 distinct proteins where 13% were predicted to have an extracellular expression, 65% at the cytoplasmic level and 22% within the plasma membrane. The evaluation of the immunogenic potential of these proteins was established with the prediction software VaxiJen v2.0 for which a 0.5 threshold score allowed for the identification of four score categories among the identified proteins, from 0.5 to 1.5. For the most part, proteins with the highest scores were associated with an extracellular localisation. The combination of the immunogenicity score and localisation of the analysed proteins led to the selection of 12 vaccinal candidate proteins that were mostly identified as hypothetical. A more in-depth description of these proteins would allow the assessment of their function, the evaluation of their true immunogenic potential by characterizing their interaction with the avian immune system and ultimately, evaluate their probable role in the pathogenesis of necrotic enteritis.

Keywords: Broiler chickens, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, reverse vaccinology, candidate proteins, vaccine.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations	10
Remerciements	12
Introduction.....	13
Chapitre 1 – Le phénomène de résistance aux antimicrobiens.....	15
Description du phénomène d’antibiorésistance.....	15
Stratégies canadiennes pour contrer la résistance aux antimicrobiens.....	16
Stratégies des producteurs de poulets du Canada contre l’antibiorésistance	17
Chapitre 2 – L’entérite nécrotique aviaire	19
Problématique.....	19
Description de la maladie.....	19
Facteurs de prédisposition à l’entérite nécrotique.....	20
Infection à <i>Eimeria</i>	20
Changement du milieu digestif et de la paroi intestinale.....	20
Changement du statut immunitaire.....	21
Changement du microbiote intestinal	21
Chapitre 3 – <i>Clostridium perfringens</i>	23
Caractéristiques de la bactérie.....	23
Épidémiologie.....	24

Virulence.....	25
Chapitre 4 – Contrôle de <i>C. perfringens</i> et de l’entérite nécrotique aviaire	31
Changement de diète, probiotiques, prébiotiques et huiles essentielles	31
Vaccination	32
Chapitre 5 – Vaccinologie réverse.....	35
Mise en contexte.....	35
Description de la vaccinologie réverse.....	35
Historique de la méthodologie.....	35
Autres applications de la vaccinologie réverse contre différents pathogènes.....	36
Méthodologie générale de la vaccinologie réverse	37
Limites de la méthode.....	40
Approches alternatives pour l’identification de candidats vaccinaux	41
Pertinence pour la production avicole au Québec	41
Chapitre 6 : Hypothèse et objectifs.....	43
Manuscrit en préparation pour le journal BMC Genomics: Comparative genomics reveals great diversity in <i>Clostridium perfringens</i> genomes of avian origin.....	44
Abstract	44
Background.....	45
Results	46
Discussion	51
Conclusions.....	57
Methods	57
Manuscrit en préparation pour la revue Vaccine: Candidate antigenic proteins identified by reverse vaccinology in <i>Clostridium perfringens</i> genomes isolated from broiler chickens.	59

Abstract	59
Background.....	60
Methods	62
Results	64
Discussion	68
Conclusion	72
Discussion générale.....	73
Mise en contexte.....	73
Diversité génomique des souches de <i>C. perfringens</i>	73
Protéome des souches de <i>C. perfringens</i>	77
Vaccinologie réverse	79
Description des protéines candidates.....	81
Observations	83
Conclusion générale	84
Perspectives	85
Références bibliographiques.....	86

Liste des tableaux

Tableau I : Catégories d'antibiotiques d'importance en production avicole.....	18
Tableau II: Assembly statistics of <i>C. perfringens</i> genome.....	47
Tableau III: Genome composition of <i>C. perfringens</i> strains.....	48
Tableau IV: Protein subcellular localization	49
Tableau V: Predicted subcellular localisation of proteins in <i>C. perfringens</i> genomes.....	49
Tableau VI: Prediction of plasmid components in <i>C. perfringens</i> genomes	50
Tableau VII: Description of predicted plasmid components in <i>C. perfringens</i> genomes.....	50
Tableau VIII: Prediction of antibiotic resistance genes in <i>C. perfringens</i> genomes.....	51
Tableau IX: Prediction of most common phages or prophages regions in <i>C. perfringens</i>	51
Tableau X: Virulent and commensal <i>C. perfringens</i> strains' profiles and genome assembly description.....	64
Tableau XI: Comparison of protein sub-cellular localisation predictions for virulent and commensal <i>C. perfringens</i> strains	65
Tableau XII: Immunogenic potential of all proteins in virulent and commensal genomes of <i>C. perfringens</i>	66
Tableau XIII: Characteristics of selected vaccinal candidate proteins of <i>C. perfringens</i> . Predicted localisation is described as Ex: extracellular, Cy: cytoplasmic, M: membrane, CW: cell wall	67

Liste des figures

Figure 1. – Schéma séquentiel de l’approche par vaccinologie réverse.	39
Figure 2. – Pangenome analysis of 48 <i>Clostridium perfringens</i> strains	48

Liste des sigles et abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé

PPC : Producteurs de poulet du Canada

EN : Entérite nécrotique

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

FCT: Fibronectin-binding, collagen-binding, T-antigen

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

*À la meilleure famille du monde,
Pour vos encouragements, votre patience et votre amour.*

Remerciements

Je tiens à remercier tous les acteurs impliqués dans ce projet de recherche. Je voudrais particulièrement remercier les personnes suivantes :

J'aimerais remercier ma directrice Dre Marie-Lou Gaucher pour son encadrement, ses conseils et son support. Je n'aurais pas pu demander mieux en termes de direction. Ta passion et ton enthousiasme sont contagieux et ton expertise fait grandir.

Je souligne aussi et je remercie mon co-directeur Dr Alexandre Thibodeau pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils scientifiques et techniques.

Un merci tout spécial aux membres de la CRSV pour leur support moral, leurs commentaires et leurs suggestions.

Merci aux partenaires industriels pour leur implication financière dans ce projet de recherche : Programme Innov'action du MAPAQ, DCL Nutrition & Santé Animale Inc.

Je termine en remerciant ma famille; mes parents, les chefs, Khalid et Fatima; mes sœurs Amina et Linda; mes neveux Malik et Naeem; *my Love* Aziz. Merci pour votre éternel support, *I made it!*

Introduction

Depuis la fin des années 90, l'utilisation de plusieurs antimicrobiens, notamment les agents promoteurs de croissance, a été réduite ou éliminée en production animale afin de contrer le phénomène grandissant de la résistance aux antibiotiques (Casewell et al., 2003). Au Canada, l'élimination des antibiotiques de catégories 1 à 3 était un des objectifs du cadre d'action fédéral s'échelonnant de 2014 à 2018 et s'intitulant « résistance et recours aux antimicrobiens au Canada » (ASPC, 2018). Une des conséquences majeures observée, à la fois au Canada et dans certains pays européens, à la suite de ces mesures est la réémergence de maladies animales, précédemment contrôlées par l'usage routinier des antibiotiques (Gaucher et al., 2015). Parmi ces maladies, l'entérite nécrotique pose un réel défi pour l'industrie avicole au Canada, causant des pertes économiques considérables (Casewell et al., 2003). Malgré la présence de plusieurs facteurs de prédisposition, tels que les infections par *Eimeria* causant la coccidiose, le statut immunitaire des oiseaux et une diète riche en protéines et en polysaccharides non-amylacés, *Clostridium perfringens* a été identifié comme l'agent causal principal.

Cette bactérie est présente de manière ubiquitaire dans l'environnement et dans le microbiote intestinal de plusieurs animaux (Prescott et al., 2016). Selon les différentes combinaisons de toxines qu'elles produisent, on classe les souches de *C. perfringens* en sept toxinotypes. Celles appartenant au type G sont reconnues pour causer l'entérite nécrotique (Rood et al., 2018). La pathogénicité de la bactérie a principalement été associée à la toxine NetB, identifiée sur l'un des trois loci de pathogénicité, faisant partie de larges plasmides conjugatifs pour certains d'entre eux (Lepp et al., 2010). Les divers facteurs de virulence connus et ceux restant à être identifiés pour mieux comprendre la virulence de la bactérie font de *C. perfringens* un pathogène redoutable nécessitant la recherche continue de méthodes efficaces pour le contrôle et la prévention de l'entérite nécrotique (Kiu et al., 2018).

Plusieurs alternatives aux antibiotiques ont été proposées pour la prévention de l'entérite nécrotique telles que l'ajout de probiotiques, de prébiotiques et d'huiles essentielles à la diète, ainsi que la thérapie par les phages et la vaccination (Kiu et al., 2018). À ce jour, aucune de ces méthodes ne s'est avérée aussi efficace que les antibiotiques pour la prévention et le traitement de l'entérite nécrotique aviaire. Cependant, le développement des technologies de séquençage à haut débit ainsi que les méthodes génomiques computationnelles ont permis l'analyse en profondeur de données

génomiques (Delany et al., 2013). Chez plusieurs genres bactériens, mentionnés ultérieurement, l'application de ces méthodes au développement de vaccin a mené vers l'utilisation de la vaccinologie réverse pour l'identification d'antigènes grâce à des analyses bio-informatiques (Delany et al., 2013). Pour la rapidité d'identification de protéines vaccinales candidates à partir du génome complet de *C. perfringens*, cette stratégie constitue une avenue des plus prometteuses pour le développement d'un vaccin efficace pour la prévention et le contrôle de l'entérite nécrotique aviaire.

Chapitre 1 – Le phénomène de résistance aux antimicrobiens

Description du phénomène d'antibiorésistance

Le résistome se définit par l'ensemble de gènes conférant une résistance aux pathogènes (Perry et al., 2014). La résistance aux antibiotiques a longtemps été observée. Cependant, l'utilisation massive des antibiotiques dans les récentes années a mené à une accentuation du phénomène (Perry et al., 2014). Le phénomène de la résistance aux antimicrobiens survient lorsque des microorganismes sont exposés aux antibiotiques qui appliquent alors une pression de sélection sur une population microbienne. Cet effet de pression mène à une plus grande chance de survie et de prolifération des bactéries naturellement résistantes ou ayant acquis des gènes de résistance (Prestinaci et al., 2015; Read et al., 2014). Chez les bactéries, la résistance peut se développer de différentes manières. Elle peut être consécutive à des mutations spontanées, mais aussi être associée à la présence de gènes de résistance hérités ou acquis. Ces derniers sont acquis via des éléments génétiques mobiles, tels que des plasmides, ou par transfert horizontal de gènes entre bactéries de la même ou de différentes espèces (Read et al., 2014).

La résistance aux antimicrobiens est considérée comme un problème d'intérêt majeur pour la santé publique. En effet, cette résistance constitue une menace dans la prévention et le traitement efficace d'un grand nombre de maladies d'origine bactérienne et reliées à un large éventail de pathogènes autant humains qu'animaux (Prestinaci et al., 2015). À travers les années, certains pathogènes bactériens ont développé une résistance à la majorité des antibiotiques disponibles sur le marché (Ventola, 2015). Cette réalité requiert donc des actions concrètes pour prévenir ou ralentir cette problématique mondiale. En 2014, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a émis un rapport sur l'antibiorésistance à travers le monde et l'importance d'agir rapidement face à ce risque sanitaire global (WHO, 2014). Le rapport démontre l'utilité des données de surveillance pour évaluer les tendances de résistance, identifier les régions où les interventions sont urgentes et faire le suivi des interventions afin de contenir la résistance (WHO, 2014). Le manque de surveillance dans plusieurs régions du monde empêche la réalisation d'un portrait global de la distribution du phénomène d'antibiorésistance (Prestinaci et al., 2015).

L'usage non-judicieux, le choix des antibiotiques et la façon de les administrer sont des facteurs majeurs à considérer. En effet, un choix inadéquat et/ou un dosage non conforme aux lignes

directrices, contribuent à la hausse de la résistance aux antibiotiques (Prestinaci et al., 2015). Dans un contexte de productions animales, l'usage à grande échelle des antimicrobiens pour la promotion de la croissance est entre autres un des facteurs majeurs reconnus pour contribuer à la problématique de l'antibiorésistance (Prestinaci et al., 2015).

Stratégies canadiennes pour contrer la résistance aux antimicrobiens

En 2014, le Canada émet un cadre d'action fédéral portant sur la réponse du gouvernement à la problématique de résistance aux antimicrobiens en mettant l'accent sur la surveillance, l'intendance et l'innovation (SC, 2014). La première mesure visait à mieux orienter les stratégies de réduction des risques liés à l'antibiorésistance par la détection et la surveillance des tendances à l'échelle nationale. En plus de l'éducation et de la sensibilisation pour le maintien de l'efficacité des pratiques existantes, le cadre d'action fédéral visait aussi à créer des balises pour l'utilisation des antibiotiques pour fins de traitements et de préventions des infections bactériennes. Finalement, la réponse du gouvernement canadien encourageait les différents axes de recherche et de développement vers la création de solutions pour palier à la diminution de l'efficacité des antimicrobiens (SC, 2014).

À la suite du lancement de ce cadre d'action fédéral, plusieurs plans fédéraux ont aussi été lancés dans le but de suivre la progression des efforts pour contrer l'antibiorésistance, ainsi que de rendre compte des nouvelles initiatives mises en œuvre (ASPC, 2015). Un rapport d'étape détaillé, publié en 2018, mettait de l'avant la progression du plan d'action fédéral depuis sa publication en 2015, en rapportant les résultats positifs et en ciblant les objectifs pour la poursuite de la lutte contre la résistance aux antimicrobiens (ASPC, 2018). Bien qu'on ait noté une augmentation de la résistance dans certains environnements, les données globales au Canada se comparaient ou étaient inférieures à celles d'autres pays. En productions animales, la distribution et la vente d'antimicrobiens ont connu une baisse depuis 2015 (ASPC, 2018). Afin de poursuivre ses efforts, le gouvernement canadien vise à améliorer la surveillance, plus particulièrement au niveau des antimicrobiens utilisés pour les animaux destinés à l'alimentation. Ces mesures visent à resserrer les réglementations sur l'importation de médicaments à usage vétérinaire, ainsi qu'à assurer un suivi rigoureux de l'utilisation des antimicrobiens (ASPC, 2018). Des fonds importants ont d'ailleurs été investis pour différentes initiatives de recherche. Ces initiatives se sont intéressées particulièrement à l'identification d'un lien entre les pratiques agricoles et la résistance aux

antimicrobiens chez les animaux de production, ainsi qu'au niveau de leur environnement. Elles se sont également penchées sur l'identification des voies d'exposition à l'antibiorésistance, tant chez l'homme via certains pathogènes, que chez les animaux et leur environnement. Un axe important de recherche et développement est aussi consacré aux études génomiques et à leur intégration dans des modèles d'analyse du risque qui permettraient de mieux orienter les stratégies, les politiques et les pratiques de contrôle de la résistance aux antimicrobiens (ASPC, 2018).

Stratégies des producteurs de poulet du Canada contre l'antibiorésistance

Les Producteurs de poulet du Canada (PPC), formant une des plus importantes industries de productions animales à l'échelle nationale, ont émis le plan stratégique de l'industrie avicole s'échelonnant de 2014 à 2018. Ce premier plan visait la croissance de la production canadienne de poulets en se concentrant sur différents aspects de l'industrie, notamment la réponse aux besoins des consommateurs, les lignes directrices clarifiées pour l'importation et l'exportation, ainsi que la médiatisation positive de l'industrie (CFC, 2014). Une des stratégies d'importance dans le plan des PPC est la réduction de l'utilisation des antibiotiques dans le but de contrer le phénomène d'antibiorésistance (CFC, 2014). Selon le classement basé sur le Directeurat des médicaments vétérinaires, présenté dans le tableau I ci-dessous, à court et long terme, la stratégie vise à réduire, voire même éliminer l'usage d'antibiotiques pouvant avoir un impact sur la santé humaine, notamment ceux de la catégorie 1 dont l'élimination a été effectuée en 2014. Le plan des PPC met aussi l'accent sur l'augmentation de l'utilisation d'alternatives acceptables aux antibiotiques dans l'alimentation des volailles (CFC, 2014). Le rapport le plus récent des PPC a été émis en 2018 afin de faire le point sur les mesures prises et celles à venir pour le contrôle de la résistance aux antimicrobiens. À la suite de l'élimination des antibiotiques de catégorie 1, les PPC ont prévu l'élimination des antibiotiques de catégorie 2 et 3 entre 2018 et 2020; en date d'aujourd'hui la catégorie 2 a bel et bien été éliminée. Donc, depuis l'élaboration du plan stratégique de réduction des antimicrobiens, seule la catégorie 3 n'a pas encore été éliminée et les PPC préconisent toujours l'utilisation d'alternatives à ceux-ci (PPC, 2018). Le tableau I présente aussi les antibiotiques de catégorie 4, ne faisant pas partie des plans d'action, puisque ceux-ci ne sont pas utilisés en médecine humaine.

Catégorie	Exemple d'antimicrobiens	Utilisation
I	Fluoroquinolones	
	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération	
II	Aminoglycosides	Prévention des infection néonatales chez le poussin
	Lincosamides-aminocyclitols	
	Macrolides	Traitement des infections bactériennes
	Pénicillines	
	Streptogramines	Prévention des maladies entériques
	Triméthoprime-sulfamides	Traitement des infections à <i>E. coli</i> aviaire pathogène
III	Bacitracines	Prévention des maladies entériques
	Tétracyclines	Traitement des infections bactériennes
IV	Flavophospholipides	Promoteurs de croissance
	Ionophores	Gestion de la coccidiose

Tableau I : Catégories d'antibiotiques d'importance en production avicole

Tous ces rapports et ces stratégies, que ce soit au niveau mondial, national ou propre à une industrie, démontrent les réelles préoccupations face au phénomène d'antibiorésistance. Plus spécifiquement, dans le domaine de la production animale, la communauté scientifique s'inquiète d'une part des possibles maladies émergentes liées à la résistance de différents pathogènes et d'autre part les industries appréhendent les pertes économiques reliées à de telles maladies. Ces inquiétudes ne font que souligner l'importance des stratégies alternatives aux antibiotiques dans la prévention et le traitement de maladies bactériennes en productions animales.

Chapitre 2 – L'entérite nécrotique aviaire

Problématique

Plusieurs effets de la diminution ou de l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques en production animale ont été rapportés. À la fin des années 90, dans le but de répondre d'une part aux demandes des consommateurs et d'autre part aux préoccupations face à la transmission de la résistance aux antibiotiques des animaux aux humains, les pays de l'Union Européenne ont banni les antibiotiques promoteurs de croissance (Casewell et al., 2003).

Le revers de cette interdiction a été souligné dans une revue littéraire rapportant les résultats de plusieurs études dans lesquelles les auteurs ont rapporté notamment l'émergence de certaines maladies dans les élevages (Casewell et al., 2003). En production avicole par exemple et tel que les prédictions l'indiquaient, le retrait de la bacitracine, un antibiotique utilisé comme promoteur de croissance, a mené à l'émergence de l'entérite nécrotique dans les élevages de poulets au Danemark et en France (Casewell et al., 2003). En plus des conséquences néfastes sur le bien-être des animaux, les pertes économiques liées à ce changement de régime, sans promoteurs de croissance ont été considérables (Casewell et al., 2003).

Description de la maladie

L'entérite nécrotique aviaire est une maladie posant un enjeu majeur et ayant des conséquences économiques évaluées à plusieurs milliards de dollars par année à travers le monde (Paiva et al., 2014). La forme sous-clinique de la maladie ne présente pas de signes sévères et n'est souvent pas diagnostiquée; elle reste donc non-traitée et se traduit par une baisse de la performance des oiseaux (Paiva et al., 2014). Cette diminution de performance est associée à des dommages chroniques à la muqueuse intestinale, ce qui implique une digestion et une absorption inadéquates des nutriments, résultant ainsi en une diminution de la prise de poids des oiseaux (Paiva et al., 2014). Lorsque présents, les signes cliniques sont l'anorexie, la diarrhée, la déshydratation et une altération du plumage. Dans les cas cliniques sévères, on observe des lésions importantes de la muqueuse intestinale, ainsi qu'une forte réaction inflammatoire. En général, ces cas cliniques surviennent de manière soudaine et entraînent une augmentation marquée et rapide de la mortalité dans les élevages de poulets (Paiva et al., 2014).

Facteurs de prédisposition à l'entérite nécrotique

Le développement de l'entérite nécrotique est complexe et multifactoriel (Moore, 2016). Une augmentation de la population intestinale du pathogène *C. perfringens* a été identifiée comme étant la principale cause d'entérite nécrotique chez les poulets de chair (Keyburn et al., 2010). Cependant, plusieurs facteurs connus prédisposent les oiseaux au développement de l'entérite nécrotique. Ils peuvent être regroupés sous trois catégories : les changements au niveau du tractus gastrointestinal, les changements du statut immunitaire de l'animal et les changements du microbiote intestinal (Moore, 2016).

Infection à *Eimeria*

L'infection à *Eimeria*, causant la coccidiose, est un facteur important prédisposant à l'entérite nécrotique. Plusieurs effets ont été observés chez l'hôte, dont les dommages physiques à la paroi intestinale, la modulation du système immunitaire et la mucogénèse (Moore, 2016). Les dommages physiques engendrés par la coccidiose favorisent la colonisation et la prolifération de *C. perfringens*. Ces dommages à la paroi intestinale mettent à disposition des nutriments essentiels à la croissance de *C. perfringens* et entraînent la production de mucus, source protéique importante à la prolifération de la bactérie (Moore, 2016). De plus, certaines protéines de la matrice extracellulaire sont alors mises en évidence, telles que le collagène, maintenant associé à l'adhérence de *C. perfringens* (Moore, 2016; Wade et al., 2016).

Changement du milieu digestif et de la paroi intestinale

Certains éléments de la diète des poulets de chair peuvent faire varier les propriétés physiques de l'ensemble du système digestif, ainsi que le microbiote intestinal. Ces éléments font donc partie des facteurs de prédisposition au développement de l'entérite nécrotique (Moore, 2016). Les oiseaux d'élevages qui sont nourris en suivant des diètes riches en blé, en seigle, en avoine ou en orge ont un risque plus élevé de développer l'entérite nécrotique que ceux ayant une diète plus riche en maïs par exemple. Ceci peut s'expliquer par le contenu élevé en polysaccharides à faible teneur en amidon qui favorisent l'augmentation de la viscosité du digesta et la disponibilité de substrats pour *C. perfringens* (Moore, 2016). Les diètes riches en protéines, notamment celles contenant de la farine de poisson, ont été associées à l'entérite nécrotique dû à la disponibilité d'acides aminés essentiels à la croissance de *C. perfringens* (Wu et al., 2014). De plus, les infections par *Eimeria*, l'agent causal de la coccidiose aviaire, sont responsables des dommages

physiques à la paroi gastrointestinale, compromettant ainsi son intégrité. Cela affecte particulièrement les barrières épithéliales en donnant un accès à la couche basale de l'intestin, constituant un site primaire dans les étapes de développement de la maladie (Moore, 2016). Ces dommages, en plus de fournir au pathogène une source de nutriments essentiels par la présence de protéines sériques et de mucus dans l'intestin, exposent aussi plusieurs molécules extracellulaires ayant une importance dans le processus de colonisation de *C. perfringens*, telles que le collagène et la fibronectine (Moore, 2016).

Changement du statut immunitaire

L'entérite nécrotique, comme plusieurs autres maladies, peut se développer à la suite de changements du statut immunitaire des animaux. Une hypothèse proposée stipule que chez les poulets de chair âgés d'environ 21 jours, le risque plus élevé de développer la maladie serait dû à la baisse d'anticorps maternels dans la circulation sanguine, rendant ainsi les oiseaux plus susceptibles à l'infection (Moore, 2016). Aussi, l'effet de l'immunosuppression causée par des infections bactériennes ou virales concomitantes telles que la bursite infectieuse peut augmenter la susceptibilité des oiseaux à développer l'entérite nécrotique, en plus d'augmenter la sévérité de la maladie (Moore, 2016). L'immunosuppression peut aussi être causée par différents facteurs de stress, tels que le surpeuplement sur les parquets d'élevage, augmentant ainsi les risques d'infection par des pathogènes (Moore, 2016).

Changement du microbiote intestinal

L'entérite nécrotique peut être observée principalement par des lésions de la région supérieure de l'intestin, où les populations de Lactobacilles sont majoritaires. Au niveau du caecum, les populations bactériennes sont nombreuses et forment un microbiote diversifié chez les oiseaux adultes (Stanley et al., 2012). Le caecum constitue aussi le site principal de colonisation par *C. perfringens*. Les changements au niveau du tractus gastrointestinal, dus entre autres aux changements de diète et aux infections par *Eimeria*, peuvent modifier la composition du microbiote intestinal en sélectionnant positivement certaines populations bactériennes, dont *C. perfringens* (Moore, 2016; Wu et al., 2014). Ces modifications peuvent être observés au niveau de certaines populations clés, associées entre autres à l'immuno-modulation de l'hôte (Antonissen et al., 2016). Une réduction de l'abondance des bactéries filamenteuses et celles productrices de butyrate, telles que les *Lachnospiraceae* et les *Ruminococcaceae* respectivement, a été observée lors d'épisodes

d'entérite nécrotique (Antonissen et al., 2016). Stanley et ses collaborateurs se sont intéressés à l'effet de l'entérite nécrotique sur le microbiote et les résultats démontrent une variation de la composition au niveau caecal entre les poulets de chair sains et ceux affectés par la maladie (Stanley et al., 2012). Cependant, le lien exact entre l'apparition de l'entérite nécrotique et la composition du microbiote demeure incertain (Moore, 2016). On peut aussi bien envisager qu'une modification préliminaire de la composition du microbiote prédisposerait certains oiseaux à la maladie, qu'envisager que c'est cette dernière qui affecterait la composition du microbiote (Stanley et al., 2012). La relation cause à effet entre la composition du microbiote des poulets de chair et l'entérite nécrotique est donc toujours ambiguë (Stanley et al., 2012). Ces modifications au statut normal des poulets de chair favorisent la prolifération et la croissance de *C. perfringens*.

Chapitre 3 – Clostridium perfringens

Caractéristiques de la bactérie

Découverte pour la première fois à la fin du 19^e siècle, *Clostridium perfringens* est une bactérie gram positive vivant en anaérobie et capable de former des spores (Rood et al., 2018). Elle est omniprésente dans différents environnements, dans le sol, mais aussi dans le microbiote intestinal des animaux et des humains (Keyburn et al., 2008). Malgré sa présence de manière commensale dans l'intestin, cette bactérie est un important pathogène chez les humains et les animaux, causant ainsi plusieurs maladies (Parreira et al., 2012). Chez l'humain, le pathogène cause principalement la gangrène gazeuse et des intoxications alimentaires. Chez les animaux, plusieurs enterotoxémies telles que l'entérite nécrotique ont été associées à *C. perfringens* (Keyburn et al., 2008). Les diverses manifestations cliniques associées à *C. perfringens* sont attribuables à la diversité génétique des souches de cette espèce bactérienne, entre autres à la capacité à produire un large éventail de toxines, mais aussi aux caractéristiques génomiques de la bactérie (Lepp et al., 2010).

Classification

Lorsqu'isolée pour la première fois, la bactérie a été classée comme nouvelle espèce du genre *Bacillus*, avant la proposition de nomenclature pour le genre *Clostridium* au début du 20^e siècle (Rood et al., 2018). Depuis qu'il a été démontré que *C. perfringens* produisait des exotoxines, le schéma de classification par toxinotypage a été modifié à quatre reprises. Cette classification consiste à classer les souches de la bactérie en fonction des toxines produites (Rood et al., 2018). La plus récente modification, en 2018, consistait à proposer l'ajout de deux nouveaux toxinotypes. En effet, en plus des toxinotypes A à E déjà existants, l'ajout des types F et G mène à un schéma de classification de *C. perfringens* de sept toxinotypes (Rood et al., 2018). Les différents types de *C. perfringens* causent entre autres la gangrène gazeuse chez l'humain, l'entérite nécrotique, ainsi que des entérotoxémies chez plusieurs animaux (Rood et al., 2018).

Cette dernière modification vient en réponse au manque de précision de la classification par rapport aux avancés scientifiques effectuées sur les différentes souches de la bactérie et sur la diversité des génomes (Rood et al., 2018). Par exemple, le type A contenait des différences considérables en termes de production de toxines et de maladies causées par les souches incluses dans ce type. Par

exemple, ce même type regroupait les souches causant les toxi-infections alimentaires, celles causant la gangrène gazeuse, ainsi que celles causant l'entérite nécrotique (Rood et al., 2018). De ce fait, afin de préserver l'exactitude tant au niveau diagnostique qu'épidémiologique, une mise à jour du schéma de classification était nécessaire (Rood et al., 2018).

Le nouveau type G de *C. perfringens* a été associé à l'entérite nécrotique aviaire (Rood et al., 2018). Les souches de ce type produisent la toxine alpha et la toxine NetB, mais ne produisent pas les trois autres toxines associées aux autres types de la bactérie. Le type G diffère donc du type A seulement par la production de la toxine NetB, un des principaux facteurs de virulence connu à ce jour et fortement associé à l'entérite nécrotique aviaire (Rood et al., 2018).

Épidémiologie

C. perfringens est un habitant normal du tractus intestinal des volailles et est ainsi largement retrouvé dans la viande transformée de poulets de chair. Entre 75% et 95% des poulets sont positifs pour la présence de *C. perfringens* quand leur contenu intestinal est analysé et jusqu'à 80% de la viande transformée est également testée positive (Van Immerseel et al., 2004). Il a été rapporté que *C. perfringens* était présent sur des fragments de coquille d'œufs, sur le plumage des oiseaux et dans leur environnement, suggérant alors que la colonisation par *C. perfringens* d'origine aviaire pourrait avoir lieu depuis le couvoir (Van Immerseel et al., 2004). De plus, l'identification de certaines souches spécifiques de *C. perfringens* sur des carcasses de poulets de chair, indiquerait une transmission de ces souches du couvoir jusqu'au processus de transformation des viandes (Craven et al., 2003).

C. perfringens est présent de manière commensale dans le tractus intestinal des poulets et il a été démontré que plusieurs clones différents sont retrouvés, tant dans l'élevage que chez l'individu lui-même (Barbara et al., 2008; Van Immerseel et al., 2004). Cependant, une étude a démontré que la richesse génotypique de la population de *C. perfringens* pourrait prédisposer les poulets au développement de l'entérite nécrotique. En effet, une richesse augmentée favorise la présence de clones virulents parmi la population de *C. perfringens* (Gaucher et al., 2017). Il a ensuite été démontré que la chute de cette richesse génotypique à la suite d'épisodes récurrents de la maladie était associée à la sélection de clones virulents au détriment d'autres clones dits commensaux (Barbara et al., 2008; Gaucher et al., 2017). Cette sélection peut s'expliquer par la présence de plusieurs facteurs de virulence pouvant accorder un avantage compétitif à certains clones de la

bactérie. Parmi ces éléments, les gènes codant pour des toxines, des gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes de virulence tels que des adhésines peuvent contribuer à cet avantage (Barbara et al., 2008). Ces facteurs fournissent donc fort probablement un avantage adaptatif aux clones virulents, qui dès lors se multiplient et prennent le dessus sur les clones non-virulents de *C. perfringens* (Gaucher et al., 2017).

Une implication importante pour l'épidémiologie de *C. perfringens* est la conjugaison permettant ainsi le partage des facteurs de virulence (Rood et al., 2016). En effet, le partage de matériel génétique entre souches de *C. perfringens* implique qu'une souche non-pathogène pourrait acquérir des facteurs de virulence par transfert de gènes et ainsi devenir virulente. Sous des conditions favorables, ceci pourrait aussi impliquer qu'une souche endogène ayant déjà colonisé les tissus de l'hôte pourrait acquérir un plasmide de virulence codant pour la toxine NetB par une souche exogène et ainsi causer à son tour l'entérite nécrotique (Rood et al., 2016). Ce transfert par de larges plasmides conjugatifs entre génomes de *C. perfringens* module donc la structure de la population de la bactérie et en démontre la complexité épidémiologique. De plus amples recherches seraient nécessaires afin d'identifier la possibilité de transfert de facteurs de virulence connus entre les différentes souches, tel un transfert de la toxine NetB. Cependant, des études récentes ont démontré la présence d'une signature génétique chromosomique chez les souches causant l'entérite nécrotique, démontrant davantage que l'unique présence d'un facteur de virulence n'est pas suffisante pour causer la maladie (Lacey et al., 2018).

Virulence

La virulence de *C. perfringens* est gouvernée par une multitude de facteurs qui rendent d'autant plus complexe la compréhension de la pathogénèse de l'infection. Le principal facteur par lequel *C. perfringens* peut causer la maladie est la production de plusieurs toxines, quoi que d'autres facteurs semblent contribuer (Van Immerseel et al., 2009). Dans un contexte d'entérite nécrotique, la toxine NetB a été identifiée comme le facteur contribuant majeur, bien que non le seul puisqu'il a été démontré que l'unique présence du gène *netB* codant pour cette toxine ne suffisait pas à causer la maladie (Gaucher et al., 2017; Prescott et al., 2016; Zhou et al., 2017).

Toxines

Il a longtemps été considéré que la toxine alpha produite par les cinq différents types de *C. perfringens*, était le facteur de virulence principal associé à l'entérite nécrotique (Van Immerseel et al., 2009). Codée par le gène *plc*, la toxine alpha est aussi connue comme étant une phospholipase C et une sphingomyélinase, dont l'activité est principalement impliquée dans la pathogénie de la gangrène gazeuse chez l'humain (Keyburn et al., 2006). En 2006, Keyburn et ses collaborateurs ont démontré que la toxine alpha n'était pas un facteur indispensable à l'apparition de l'entérite nécrotique chez les poulets de chair (Keyburn et al., 2006). En effet, un modèle expérimental impliquant des souches mutantes pour le gène *plc* a été réalisé et les observations démontrent la présence d'entérite nécrotique malgré l'absence de production de la toxine alpha par les souches de *C. perfringens* mutantes. Cela démontre donc que la toxine alpha ne serait pas essentielle au développement de la maladie, tel que précédemment supposé, et que cela implique que plusieurs autres facteurs de virulence sont en cause (Keyburn et al., 2006).

Depuis plusieurs années, dans le but de mieux caractériser la pathogénicité de *C. perfringens*, plusieurs études ont tentées d'identifier les facteurs de virulence liés au développement de l'entérite nécrotique. Parmi ces études, le rôle des toxines produites par *C. perfringens* a été exploré. De la même manière que pour la toxine alpha, deux souches mutantes, provenant de la même souche, négatives à NetB ont été testées dans un modèle expérimental d'entérite nécrotique (Keyburn et al., 2008). Puisque le modèle a démontré que les mutants ne causaient pas la maladie, il a été proposé que la toxine NetB soit identifiée comme étant le principal facteur de virulence des souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique (Keyburn et al., 2008). Cette toxine est classée parmi une famille de toxines connues pour leur capacité à former des pores (Prescott et al., 2016). L'action de NetB consiste à former des pores dans les membranes cellulaires, causant ainsi un écoulement du contenu cellulaire et éventuellement, la mort de la cellule bactérienne (Prescott et al., 2016). L'activité de NetB fait suite à la colonisation et à la dégradation des muqueuses intestinales par différents facteurs, tels que des adhésines, des mucinases et des hydrolases.

Contrairement à ce qui avait précédemment été rapporté, la toxine NetB est retrouvée chez les souches dites virulentes, mais aussi chez certaines souches considérées comme non-pathogènes. Ceci laisse donc croire à la contribution de différents autres facteurs de virulence dans le développement de l'entérite nécrotique chez le poulet (Prescott et al., 2016; Rood et al., 2016). De

plus, certaines souches causant l'entérite nécrotique se sont avérées négatives pour la production de NetB, ce qui démontre que l'unique présence de cette toxine n'est pas suffisante pour causer l'entérite nécrotique (Zhou et al., 2017)

Plasmides

Grâce aux avancées technologiques liées au séquençage génomique, plusieurs gènes de *C. perfringens* ont été proposés en tant que facteurs de virulence et bien que certains soient retrouvés dans le chromosome bactérien, plusieurs d'entre eux ont été identifiés sur des plasmides (Gyles et al., 2014). Cet ADN extra-chromosomique est généralement circulaire et peut s'auto-répliquer. Les plasmides sont composés d'une multitude de gènes aux fonctions variables (Gyles et al., 2014). En effet, il peut s'agir de gènes de résistance aux antibiotiques, de gènes liés à différents éléments d'adaptation, ainsi que différents facteurs de virulence (Lacey et al., 2018). D'ailleurs, plusieurs toxines bactériennes sont encodées par des plasmides (Gyles et al., 2014).

Chez *C. perfringens*, les souches reliées à l'entérite nécrotique possèdent jusqu'à quatre larges plasmides, allant jusqu'à une longueur de 140 kb (Lacey et al., 2017). Récemment, plusieurs plasmides ont été identifiés d'isolats liés à l'entérite nécrotique et ceux-ci ont été séquencés. Parmi les plus recensés, les plasmides pJIR3535, pJIR3844 et pJIR3537 ont été démontrés comme arborant différents gènes liés à la pathogénicité de la bactérie, dont des toxines et des gènes de résistance aux antibiotiques (Parreira et al., 2012). En plus de la toxine NetB de *C. perfringens*, plusieurs gènes ont été identifiés sur des loci de pathogénicité, propres aux souches portant NetB (Prescott et al., 2016). Parmi ces loci, NELoc-1 et NELoc-3 ont été identifiés sur de larges plasmides conjugatifs retrouvés généralement dans les souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique aviaire. NELoc-1 est composé entre autres de la toxine NetB et de plusieurs gènes possiblement importants dans la pathogénicité de la bactérie tels que des chitinases et des métalloprotéases, toutes deux jugées importantes dans la capacité de colonisation de la bactérie (Lepp et al., 2010; Prescott et al., 2016). Il a aussi été démontré que la séquence génomique de ces deux loci étaient conservée à travers les souches portant NetB, appuyant ainsi l'hypothèse de leur importance dans la virulence de *C. perfringens* (Lepp et al., 2013). De plus, les plasmides de *C. perfringens* semblent tous partager une même séquence conservée composée, entre autres, du locus de conjugaison *tcp* appartenant à la famille de plasmides semblables à pCW3. Les onze gènes

retrouvés sur le locus *tcp* sont essentiels au transfert de gènes par conjugaison entre bactéries (Parreira et al., 2012).

Phages

Les bactériophages ou phages peuvent avoir un impact considérable sur le remodelage des populations bactériennes. Les avancées dans le domaine de la génomique ont permis d'améliorer la compréhension de ces impacts, particulièrement en rapport au phénomène de résistance aux antibiotiques (Torres-Barcelo, 2018). Selon plusieurs hypothèses, les phages pourraient avoir un rôle de prédateurs et donc être utilisés comme moyen de contrôle contre les bactéries résistantes, ou plutôt avoir un rôle de facilitateur dans les processus régissant le transfert de gènes entre bactéries (Torres-Barcelo, 2018).

Les phages sont des virus à ADN ou ARN généralement encapsulés dans une capsidie protéique. Ils s'attachent à un ou plusieurs récepteurs à la surface des bactéries et y insèrent leur génome (Torres-Barcelo, 2018). Dans le cas de phages virulents, l'insertion de leur génome est suivie par la manipulation de la machinerie cellulaire de la bactérie dans le but de reproduire le génome viral, provoquer la lyse de la cellule et ainsi libérer une grande quantité de nouveaux phages (Torres-Barcelo, 2018). D'une autre manière, les phages peuvent insérer leur génome dans la cellule de l'hôte, soit en l'intégrant dans le chromosome, soit sous forme de plasmide libre. La cellule est dès lors définie comme prophage (Torres-Barcelo, 2018). Les segments insérés peuvent être reconnus par une analyse de la séquence génomique de la bactérie, en se basant sur des marqueurs génétiques associés au transfert d'ADN tels que des séquences d'insertion, des répétitions en tandem ou des répétitions inversées (Gyles et al., 2014).

Chez *C. perfringens*, une grande diversité de séquence propages est observée. Ces séquences proviennent de plusieurs genres bactériens, tels que *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Clostridium*, ce qui augmente davantage la diversité de *C. perfringens* (Kiu et al., 2017). Une importante fonction associée à plusieurs des bactériophages identifiés de *C. perfringens*, tels que CP51 et ϕ 3626, est l'amélioration de l'activité de sporulation, favorisant donc la survie de la bactérie. De plus, plusieurs gènes provenant de prophages ont été associés à la sécrétion de toxines chez d'autres espèces bactériennes, dont *Clostridium difficile* (Kiu et al., 2017). Il est donc possible de penser qu'une intégration de ce genre de séquence pourrait aussi être retrouvé chez *C. perfringens*.

Enzymes

Certaines enzymes de *C. perfringens* ont été identifiées comme facteurs de virulence, dû à leur implication dans la pathogénèse de l'entérite nécrotique. Ces enzymes jouent un rôle important dans la colonisation et la prolifération de ce pathogène. Une des premières barrières à la colonisation par un pathogène est la couche de mucus de l'intestin (MacMillan et al., 2019). Lors de l'infection par *C. perfringens*, certains facteurs favorisent la dégradation de cette couche et permettent alors la colonisation par la bactérie (MacMillan et al., 2019). Tel que mentionné précédemment, une infection préalable par *Eimeria*, causant la coccidiose, rend disponible le mucus en causant des dommages physiques à la paroi intestinale (Moore, 2016). Le mucus disponible est alors dégradé par *C. perfringens* à l'aide d'enzymes, telles que des glycosidases, des métalloprotéases et des sulfatases (MacMillan et al., 2019). De plus, deux chitinases, capables de dégrader les mucines, ont été identifiées sur le locus de pathogénicité NELoc-1 (Prescott et al., 2016). Il a aussi été proposé que *C. perfringens* sécrète des collagénases, responsable de la modification des structures extracellulaires de l'hôte, par leur action dégradative des liaisons peptidiques du collagène (Prescott et al., 2016; Timbermont et al., 2011).

Adhésines

La capacité d'adhérer aux composantes de la surface extracellulaire de l'hôte, par exemple au collagène, est une caractéristique importante des bactéries pathogènes (Wade et al., 2015). L'adhésion est impliquée dans les premières étapes de la pathogénie d'une maladie, puisqu'elle permet la colonisation de la bactérie (Wade et al., 2016). Chez *C. perfringens*, très peu d'études se sont penchées sur les propriétés d'adhésion de la bactérie et sur les protéines impliquées, ce qui est tout de même étonnant vu l'importance de l'adhésion dans la virulence de plusieurs autres bactéries (Wade et al., 2015).

Avec l'identification de nouveaux facteurs de virulence, dont les plasmides porteurs du gène codant pour la toxine NetB, un gène d'adhésion au collagène a été identifié sur la région chromosomique VR-10B (Lepp et al., 2013). Il a été démontré par la suite que les cinq premiers gènes du locus VR-10B sont exprimés en un opéron unique, surnommé le locus d'adhésion au collagène (CA) (Wade et al., 2016). Le gène *CnaA* a été associé à l'adhésion au collagène de type IV et de type V (Wade et al., 2015). Il a aussi été démontré que certaines souches de *C. perfringens* n'avaient pas la capacité d'adhérer au collagène de type IV et V en l'absence du gène *CnaA*. De plus, ce gène a été

associé aux souches virulentes de *C. perfringens* dû à sa présence uniquement chez les souches positives pour *netB* et causant l'entérite nécrotique (Wade et al., 2015). Cependant, une autre étude a aussi montré la présence du gène *CnaA* chez des souches négatives pour *netB* (Lepp et al., 2013). Une étude plus approfondie de la prévalence du gène *CnaA* dans les souches de *C. perfringens*, ainsi que l'identification d'autres adhésines permettrait de comprendre et caractériser davantage le rôle de l'adhésion dans la virulence de ce pathogène.

Chapitre 4 – Contrôle de C. perfringens et de l'entérite nécrotique aviaire

Les méthodes de contrôle de *C. perfringens* en production avicole sont variées et sont souvent utilisées en combinaison. Depuis l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques dans la diète des poulets de chair, la réémergence de l'entérite nécrotique nécessitait des méthodes alternatives de contrôle et de traitement. La maladie étant multifactorielle, ces méthodes alternatives visent donc les différents facteurs de prédisposition à l'entérite nécrotique, ainsi que l'agent causal principal, *C. perfringens*.

Changement de diète, probiotiques, prébiotiques et huiles essentielles

Le changement de diète vise à réduire le contenu indigestible, riche en carbohydrates, ainsi que le taux protéique de la diète (M'Sadeq et al., 2015). Cette méthode alternative cible donc les diètes riches en blé, orge ou seigle puisqu'elles augmentent la viscosité du digesta, ralentissent le temps de transit intestinal et favorisent ainsi le développement de l'EN en fournissant les nutriments et le temps nécessaires à la multiplication de *C. perfringens* (Dahiya et al., 2006). Une des avenues de prévention en cours d'étude implique l'ajout d'enzymes exogènes qui malgré l'absence d'effet direct sur *C. perfringens*, pourraient modifier la composition du microbiote intestinal (M'Sadeq et al., 2015). Par exemple, l'ajout de xylanase a démontré une réduction de la viscosité de la paroi intestinale et une augmentation de la digestion de nutriments, réduisant ainsi leur disponibilité à la population bactérienne de l'intestin (M'Sadeq et al., 2015).

De la même manière, les probiotiques permettraient de diminuer la colonisation par *C. perfringens* et de réduire la quantité et la sévérité des lésions au niveau de l'intestin des poulets (M'Sadeq et al., 2015). La revue de M'Sadeq (2015) rapportent les résultats de différentes études, qui ont observé une baisse du compte de *C. perfringens* et un taux de mortalité réduit suite à l'ajout de bactéries lactiques au régime des poulets de chair (M'Sadeq et al., 2015). Des observations similaires ont pu être faites lors d'études portant sur l'ajout de prébiotiques à la diète, plus spécifiquement les mannan-oligosaccharides (MOS) et les fructo-oligosaccharides (FOS) (M'Sadeq et al., 2015).

Les huiles essentielles sont des composés aromatiques volatils extraits des plantes. Elles sont considérées comme alternatives aux antibiotiques dû à leur propriétés antimicrobiennes (Cross et al., 2007). Certaines études ont été menées sur les poulets de chair afin d'évaluer l'effet d'additifs alimentaires provenant d'herbes et d'huiles essentielles dans le but d'identifier une alternative efficace aux antibiotiques (Cross et al., 2007; Mueller et al., 2012). Il a été suggéré que l'utilisation d'huiles essentielles contribuerait positivement à la croissance et la performance des poulets en améliorant la sécrétion d'enzymes digestives, la digestibilité des nutriments et la palatabilité des aliments (Mueller et al., 2012). Par exemple, il a été montré que l'huile de thym aurait des effets positifs sur la croissance et la conversion alimentaire (Cross et al., 2007). Cependant, les résultats quant à l'efficacité de différentes huiles essentielles restent incertains, puisque les rapports démontrent une grande variabilité des résultats et des effets observés sur les poulets de chair (Mueller et al., 2012). Il a toutefois été suggéré que la combinaison de différentes herbes et huiles essentielles serait une alternative intéressante selon le mélange effectué, sa qualité et sa concentration (Cross et al., 2007). Une étude spécifique à *C. perfringens* a démontré l'efficacité de l'acide laurique, du thymol et du cinnamaldéhyde dans l'inhibition de la croissance et de la prolifération de la bactérie (Timbermont et al., 2010). L'utilisation de tels composés pour contrer *C. perfringens* est encore peu documentée.

L'utilisation combinée de ces différentes alternatives pourrait réduire l'incidence de l'entérite nécrotique en modulant la composition du microbiote intestinal, en diminuant la présence de *C. perfringens* et en abaissant les taux de mortalité lors d'une éclosion d'entérite nécrotique. Toutefois, aucune des stratégies de contrôle liées au changement de diète n'a pu permettre une protection intégrale contre *C. perfringens* pathogène et donc contre l'incidence de la maladie.

Vaccination

Dans le but d'identifier une alternative aux antibiotiques efficace, la vaccination a été rapidement proposée vu son succès dans la prévention et le traitement de plusieurs autres maladies. Pour l'industrie avicole, la vaccination semble être l'approche la plus prometteuse afin de contrôler l'entérite nécrotique causée par *C. perfringens*.

Le contrôle de l'entérite nécrotique passe entre autres par le contrôle des facteurs de prédisposition à la maladie. De ce fait, puisqu'il s'agit d'un des éléments les plus prédisposants, la vaccination contre la coccidiose fait partie des méthodes de contrôle de l'entérite nécrotique (M'Sadeq et al.,

2015). Il existe trois types de vaccins contre la coccidiose et tous sont basés sur le fait que la présence d'une certaine quantité du parasite *Eimeria* induit une immunité protectrice lors du cycle normal de la coccidie. En contrôlant les souches et l'inoculum, il devient donc possible de créer une réponse immunitaire contre *Eimeria* sans causer de coccidiose clinique (Vermeulen et al., 2001). Les vaccins composés de souches vivantes atténuées ont démontré une réduction de la prolifération du parasite et donc d'une réduction des dommages causés au niveau de la paroi intestinale des poulets (Vermeulen et al., 2001). Il s'agit donc d'une cible de contrôle importante puisque les dommages causés à la paroi intestinale par *Eimeria* rendent disponibles des nutriments favorisant la prolifération de *C. perfringens* (M'Sadeq et al., 2015).

La toxine alpha de *C. perfringens* a longtemps été considérée comme un agent causal de l'entérite nécrotique (Keyburn et al., 2006). Les méthodes de contrôle et traitement de l'EN se sont donc d'abord concentrées sur l'immunisation des oiseaux en utilisant la toxine alpha. Thompson et ses collaborateurs (2006) ont proposé une immunisation utilisant la toxine alpha de souches virulentes de *C. perfringens*, suivi d'un traitement aux antibiotiques, ce qui a réduit les lésions intestinales dues à l'infection par *C. perfringens*. Une autre étude s'est penchée sur la vaccination des poules pondeuses reproductrices. En effet, puisque les anticorps maternels contre *C. perfringens* peuvent réduire l'incidence de la maladie chez les poulets de chair, il a été proposé que la vaccination de poules pondeuses pourrait accorder une protection supplémentaire contre l'EN chez les poussins (Lee et al., 2011). Suite à la vaccination et l'induction expérimentale d'EN, les poules vaccinées ont montré des taux supérieurs d'IgG contre la toxine alpha de *C. perfringens* (Lee et al., 2011). D'ailleurs, le seul vaccin commercialement disponible encore aujourd'hui est un vaccin contenant un toxoïde de la toxine alpha de *C. perfringens* et utilisé principalement pour la vaccination des poules pondeuses reproductrices (Crouch et al., 2010). Cependant, l'immunisation par une souche mutante dépourvue de la toxine alpha montrait des résultats similaires, suggérant ainsi l'implication d'autres antigènes bactériens, autres que la toxine alpha (Thompson et al., 2006). Ces observations ont été appuyées plus tard par la réfutation du rôle essentiel de l'alpha toxine dans l'entérite nécrotique (Keyburn et al., 2006).

À la suite de l'identification de la toxine NetB comme principale responsable de l'entérite nécrotique, des vaccins à base d'anatoxines ont été considérés comme alternative aux antibiotiques dans le traitement de la maladie (Zahoor et al., 2018). En utilisant une méthode de prévention avec

la toxine recombinante NetB (rNetB), une production plus importante d'IgY a été observée chez les oiseaux immunisés et leur progéniture a montré dans une première étude une bonne protection contre l'entérite nécrotique, avec une diminution de 67% des oiseaux montrant des lésions à la paroi intestinale et une diminution de 74% du score moyen des lésions observées. (Keyburn et al., 2013). Cependant, malgré une activité immunogène augmentée, les vaccins à base d'anatoxine NetB n'ont permis qu'une protection partielle contre l'entérite nécrotique aviaire (Zahoor et al., 2018). En effet, les différentes études ont montré une protection se situant en moyenne entre 70 et 80% en utilisant la toxine NetB recombinante, native ou sous forme de toxoïde (Rood et al., 2016).

Hormis l'utilisation des toxines pour la vaccination, certains immunogènes ont été suggérés comme candidats vaccinaux. Ces antigènes ont été reconnus dans le sérum de poulets immuns à l'entérite nécrotique à la suite d'un épisode infectieux. Ces antigènes sont : la perfringolysine O, la GAPDH, la FBA (fructose-1,6-biphosphate aldolase), le facteur d'élongation G, la PFOR (pyruvate: ferrédoxine oxydoréductase) et finalement une protéine hypothétique encore non-identifiée (Kulkarni et al., 2006; Mot et al., 2014).

Malgré des résultats somme toute positifs en termes de protection contre l'entérite nécrotique, la vaccination avec le toxoïde NetB et les autres antigènes testés, seuls ou en combinaison, n'a pas permis d'atteindre le niveau de protection presque intégral précédemment accordé par l'utilisation des antibiotiques (M'Sadeq et al., 2015; Mot et al., 2014). Des recherches supplémentaires sont nécessaires quant à l'identification d'antigènes vaccinaux efficaces pour le contrôle de *C. perfringens* d'origine aviaire.

Chapitre 5 – Vaccinologie réverse

Mise en contexte

Malgré la mise en place de diverses méthodes de contrôle en réponse à la réduction ou à l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques en élevage des poulets de chair, rares sont celles ayant démontré un effet protecteur complètement efficace contre l'entérite nécrotique. Parmi les méthodes envisagées, la vaccination reste l'approche privilégiée en termes d'efficacité et de coûts. Les méthodes traditionnelles pour le développement de vaccins s'avèrent longues et fastidieuses, nécessitant l'isolement, l'inactivation, puis l'injection de microorganismes (Del Tordello et al., 2017), notamment pour des microorganismes ayant une grande diversité antigénique ou pour les pathogènes difficilement cultivables en laboratoire (Rinaudo et al., 2009). Cependant, l'arrivée des technologies dans le domaine de la génomique a grandement contribué aux avancées dans le développement de vaccins (Delany et al., 2013). En effet, les technologies de séquençage, complétées par les méthodes d'analyses computationnelles, contribuent à l'optimisation de l'analyse détaillée de différents microorganismes et diminuent le temps nécessaire au développement vaccinal (Rinaudo et al., 2009). Une des méthodes développées dans les récentes années, la vaccinologie réverse, démontre le potentiel et l'intérêt des nouvelles technologies dans le domaine de la génomique.

Description de la vaccinologie réverse

La vaccinologie réverse se définit comme étant un processus prédictif d'identification d'antigènes par l'exploration du répertoire génomique complet d'un organisme (Del Tordello et al., 2017). Contrairement aux méthodes traditionnelles, la vaccinologie réverse ne requiert pas l'isolement du microorganisme pathogène par approche classique en laboratoire. En effet, la vaccinologie réverse est basée sur des analyses *in silico* et l'accessibilité à la séquence génomique du pathogène est la seule condition expérimentale nécessaire à l'élaboration d'un protocole bio-informatique de vaccinologie réverse (Del Tordello et al., 2017).

Historique de la méthodologie

En 2000, un projet vaccinal proposait une approche par vaccinologie réverse pour l'identification de candidats vaccinaux dans le génome d'une souche de *Neisseria meningitidis* de séro groupe B

(MenB) (Pizza et al., 2000). Le premier séquençage d'une souche virulente de ce pathogène, suivi des analyses *in silico*, a permis l'identification de 90 protéines de surface ayant un pouvoir potentiellement immunogène (Del Tordello et al., 2017). Les avancées technologiques dans le domaine du séquençage ont ensuite permis la comparaison de plusieurs génomes de MenB dans le but de référencer la conservation des gènes à travers plusieurs souches pathogènes (Del Tordello et al., 2017). Les analyses bio-informatiques ont alors révélé la présence de trois antigènes conservés qui ont ultimement fait partie de la composition du premier vaccin développé par vaccinologie réverse, dont la licence légale a été octroyé en 2013 par l'EMA (*European Medicines Agency*) et par la US-FDA (*Food and Drug Administration of the United-States*) (Del Tordello et al., 2017).

Autres applications de la vaccinologie réverse contre différents pathogènes

À la suite du développement et de la commercialisation du vaccin contre MenB, plusieurs autres projets ont été réalisés selon le concept de la vaccinologie réverse. En effet, des pathogènes de différentes espèces et ayant des hôtes variés ont été le sujet de plusieurs études liées à la vaccinologie réverse, notamment *Ctenocephalides felis* (Contreras et al., 2018), *Leptospira spp.* (Dellagostin et al., 2017), *Acinetobacter baumannii* (Chiang et al., 2015) et *Campylobacter* (Meunier et al., 2016).

En ce qui a trait aux pathogènes touchant l'espèce aviaire, les essais de vaccinologie réverse ont impliqué aussi bien des agents bactériens que des agents viraux. En 2017, cinq vaccins étaient disponibles, dont quatre ciblant des virus et un visant le contrôle d'une maladie d'origine bactérienne (Jorge et al., 2017). Les pathogènes viraux ciblés sont : le virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, le virus de la maladie de Marek et le virus de la maladie de Newcastle (Jorge et al., 2017). Plus récemment, en 2019, une équipe s'est penchée sur la problématique de l'influenza aviaire A (H7N9), puisque cette maladie a un impact important sur le bien-être animal, mais aussi sur la santé humaine (Hasan et al., 2019). Une stratégie de vaccinologie réverse a donc été utilisée afin d'identifier des antigènes probables chez le virus de l'influenza, ainsi que de déterminer leur pouvoir immunogène. Cette approche a permis la sélection de huit protéines candidates, dont deux ont été incluses dans le développement du vaccin (Hasan et al., 2019).

Parmi les vaccins développés par vaccinologie réverse chez la volaille, celui permettant de contrôler la mycoplasmosse aviaire, causée par *Mycoplasma gallisepticum*, a été rendu disponible

dans les dernières années. De plus, plusieurs autres vaccins sont en développement pour contrer différents pathogènes tels que *Campylobacter spp.* pour lequel 14 candidats vaccinaux ont été identifiés (Meunier et al., 2016).

Ces études montrent les éléments prometteurs de la vaccinologie réverse et les multiples applications possibles sur une grande variété de pathogènes. Pour son efficacité et sa rapidité d'exécution, la vaccinologie réverse constitue une approche de choix pour le développement d'un vaccin. Pour la majorité des études menées actuellement, les protéines candidates vaccinales sont en cours d'analyse *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer leur réel potentiel vaccinal (Jorge et al., 2017).

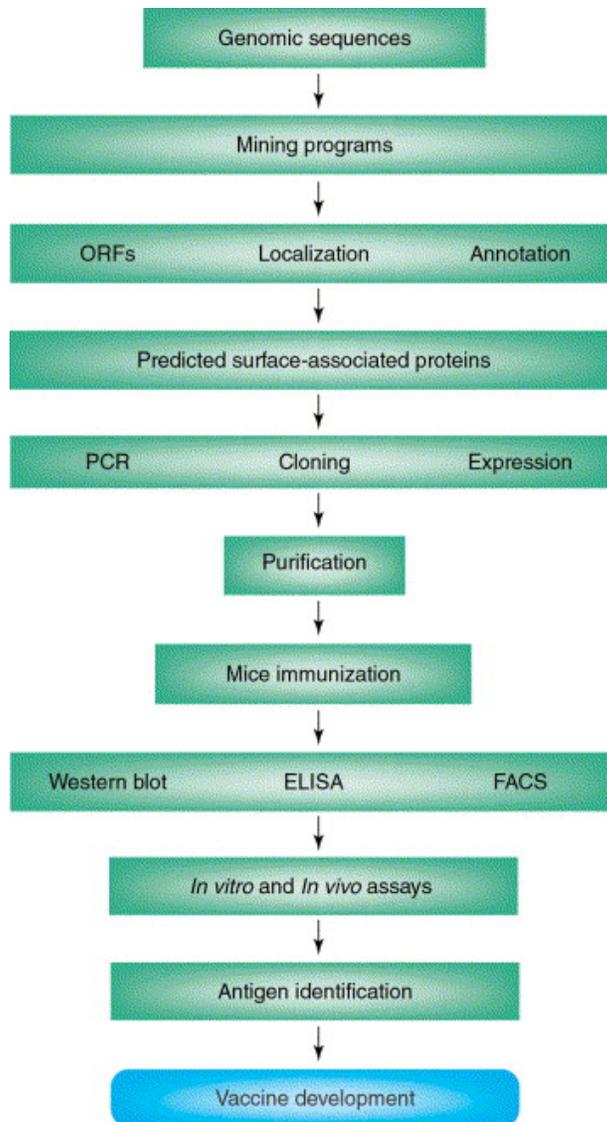
Méthodologie générale de la vaccinologie réverse

La vaccinologie réverse a connu plusieurs modifications quant à l'approche initiale proposée pour identifier des candidats vaccinaux (Donati et al., 2013). De plus, la méthode peut varier selon le projet. Cependant, certains éléments demeurent essentiels, quelle que soit la méthodologie adoptée (Donati et al., 2013). Afin de débiter un projet par vaccinologie réverse, la disponibilité du génome de l'organisme étudié est essentielle. L'étude peut porter sur des génomes déjà publiés dans des bases de données publiques ou sur des génomes séquencés suite à une extraction d'ADN d'une souche isolée en laboratoire (Rappuoli, 2000). Dans le contexte d'un projet utilisant de nouvelles données de séquençage, les séquences codant pour les génomes utilisés doivent d'abord être assemblées en utilisant divers outils bio-informatiques.

Les méthodes de séquençage utilisées sont diverses, mais font toutes parties de la nouvelle génération, communément référée comme NGS (*Next Generation Sequencing*). Ces méthodes de séquençage à haut débit ont permis d'augmenter considérablement le nombre et la qualité des séquences produites, permettant ainsi la publication d'un grand nombre de génomes depuis leur développement en 2007 (Del Tordello et al., 2017). Le séquençage à haut débit se fait via différentes méthodes : le séquençage par synthèse, le séquençage par amplification d'une molécule d'ADN, le pyroséquençage et le séquençage par ligation (Donkor, 2013). Plusieurs avantages ont été rapportés pour chacune de ces méthodes. La plateforme Illumina Miseq, utilisée pour la présente étude, utilise le séquençage par synthèse, impliquant la formation de colonies d'ADN clonal et l'ajout de nucléotides fluorescent permettant la lecture de la séquence (Donkor, 2013). Cette méthode est précise, à près de 98%, et est une des moins dispendieuses (Donkor, 2013). De

plus, le séquençage effectué pour cette étude est précis puisqu'une librairie adaptée à *C. perfringens* a été utilisée.

Tel que montré à la figure 1 ci-dessous, après l'obtention de l'assemblage génomique, d'autres logiciels sont utilisés dans le but d'identifier les régions codantes de la séquence et de les annoter (Mora et al., 2003). Les étapes subséquentes impliquent la prédiction de la localisation cellulaire des protéines et le suivi de la sélection de celles se trouvant à la surface cellulaire (Mora et al., 2003). Les étapes subséquentes, en laboratoire, permettent le clonage, l'expression et la purification des protéines précédemment sélectionnées. Leur pouvoir immunogène est ensuite établi dans des modèles animaux, menant ainsi à la sélection finale des antigènes pour le développement commercial du vaccin (Mora et al., 2003).



Drug Discovery Today

Figure 1. – Schéma séquentiel de l’approche par vaccinologie réverse.

Malgré le succès de la méthodologie décrite pour l’approche de vaccinologie réverse, certaines modifications ont été apportées au cours des années. En effet, les avancées technologiques ont permis l’amélioration de la méthode par l’augmentation de la rapidité d’analyse et la disponibilité d’outils bio-informatiques (Del Tordello et al., 2017). Plusieurs étapes de sélection *in silico* ont été proposées afin de réduire le nombre de candidats potentiels à tester *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, certaines exclusions peuvent optimiser la sélection d’antigènes candidats, tels que les antigènes ayant des similarités moléculaires avec des protéines humaines, ainsi que les protéines non-solubles comprenant plusieurs hélices transmembranaires (Del Tordello et al., 2017).

De plus, l'analyse génomique d'une seule souche n'est pas représentative de toute une espèce bactérienne. Ceci s'applique également quand on considère la diversité intra-espèce (Rosini et al., 2011). De ce fait, le développement d'un vaccin devrait au moins prendre en considération les souches majoritairement retrouvées en cas de maladie afin de pouvoir fournir une protection large contre une espèce pathogène (Rosini et al., 2011). La vaccinologie réverse inclut donc une analyse pangénomique, où plusieurs génomes de souches d'une même espèce sont analysés de manière comparative (Del Tordello et al., 2017). D'ailleurs, pour une même espèce, comme c'est le cas pour *C. perfringens*, des souches peuvent exister sous formes commensale et pathogène. L'étude comparative des génomes des souches commensales et des souches pathogènes permet d'identifier des caractéristiques génétiques spécifiques aux souches pathogènes. Il sera ainsi ensuite possible de sélectionner uniquement les protéines propres aux souches pathogènes. Cette méthode de vaccinologie soustractive implique donc l'exclusion de protéines propres à la fois aux souches commensales et pathogènes et permet de développer un vaccin ayant un spectre d'action ciblé ne perturbant pas les souches résidentes de la flore commensale (Rosini et al., 2011).

Limites de la méthode

Puisque le concept de la vaccinologie réverse repose sur la réalisation d'analyses *in silico*, une des limitations importantes de cette méthode est le manque d'information quant au comportement des protéines en conditions *in vivo*, soit au niveau de leur expression à la surface cellulaire ou au niveau de leur expression au moment d'un épisode d'entérite nécrotique (Kaushik et al., 2008). De plus, avec le nombre de plateformes d'analyse grandissant, un défi important réside donc dans le choix des outils bio-informatiques à utiliser (Del Tordello et al., 2017). Le choix de l'analyse et le temps envisagé sont à considérer afin de suivre un protocole clair de sélection de candidats vaccinaux. Le défi envisagé pour le futur de la vaccinologie réverse est l'intégration de données épidémiologiques et des données « omiques » (génomique et protéomique) et l'amélioration des plateformes bio-informatiques (Del Tordello et al., 2017). L'amélioration de la vaccinologie réverse permettra de répondre à certaines questions soulevées, dont l'accessibilité des antigènes de surface, le masquage des antigènes, l'expression et la dégradation des protéines ainsi que la modification post-traductionnelle des protéines (Del Tordello et al., 2017). Finalement, une des grandes perspectives de la vaccinologie réverse est l'intégration du domaine émergent de l'immunomique afin de dresser un portrait complet des épitopes des cellules T CD4 et CD8 présentés aux cellules immunitaires et

ainsi mieux comprendre l'immunité cellulaire et son impact sur le développement vaccinal (Del Tordello et al., 2017).

Approches alternatives pour l'identification de candidats vaccinaux

La vaccinologie réverse implique plusieurs étapes d'analyses *in silico* et prend en combinaison plusieurs approches, telles que l'approche génomique et pangénomique (Del Tordello et al., 2017). D'autres approches sont aussi utilisées pour l'identification de candidats vaccinaux. La transcriptomique permet l'étude des variations dans l'expression des gènes dans le but de mieux comprendre la pathogénèse d'une maladie. Cette approche vise l'application du séquençage de prochaine génération (NGS) et de biopuces à ADNc dans l'étude des gènes responsables de la virulence bactérienne et donc ultimement dans le développement de vaccins ciblés (Kaushik et al., 2008). Dans un contexte d'identification d'antigènes pour un but vaccinal, il importe de connaître les gènes régulés à la hausse lors d'une infection, puisqu'il serait plus probable que ceux-ci soient des candidats vaccinaux protecteurs (Kaushik et al., 2008).

L'approche par protéomique est aussi utilisée pour l'identification de candidats vaccinaux. Une séparation par gel d'électrophorèse, puis l'utilisation de la spectrométrie de masse sont les étapes principales de cette méthode (Kaushik et al., 2008). Les protéines sont ensuite clonées, exprimées et purifiées afin d'être utilisées pour des tests d'immunisation *in vitro* (Kaushik et al., 2008). Malgré l'utilisation d'un Western Blot, la limite majeure de cette méthode reste l'abondance des protéines, puisque l'identification directe des antigènes en est dépendante (Kaushik et al., 2008). Une extension de cette méthode est l'immunoprotéomique qui permet l'analyse de la réponse immunitaire engendré par l'interaction entre le pathogène et son hôte (Dwivedi et al., 2016). Chez *C. perfringens* ATCC13124, cette approche a été utilisée pour l'identification de protéines de surface telles que la phosphoglycérate kinase et le facteur d'élongation G (Dwivedi et al., 2016).

Ces approches ont le potentiel d'être utilisées en combinaison avec la vaccinologie réverse pour une identification complète et plus exacte d'antigènes vaccinaux (Kaushik et al., 2008).

Pertinence pour la production avicole au Québec

Face à la hausse importante des préoccupations des consommateurs face à l'utilisation des antibiotiques en production avicole, l'industrie tend à modifier ses façons de faire dans le but de conserver la confiance de ses consommateurs (MAPAQ, 2019). Tel que mentionné précédemment,

la diminution et l'arrêt de l'utilisation de certains antimicrobiens mènent à l'émergence de certaines maladies, telle que l'entérite nécrotique. Cette problématique peut avoir des répercussions importantes pour l'industrie avicole québécoise. En effet, malgré le taux de mortalité important que peut causer l'entérite nécrotique dans les élevages de poulets, l'industrie doit pouvoir répondre à la demande du marché, cette industrie étant sous un système de gestion de l'offre. Le poulet est une des viandes préférées des québécois avec une hausse de la consommation de 10% entre 2013 et 2017 (MAPAQ, 2019). Actuellement, le poulet représente environ 29% des achats de viande dans les grands magasins (MAPAQ, 2019). Dû à l'importance économique que représente l'industrie avicole, il incombe donc aux partenaires concernés de prioriser les recherches portant sur les alternatives aux antibiotiques (MAPAQ, 2019). La vaccinologie réverse est une approche de choix du point de vue du coût et du temps de réalisation. Le développement d'un vaccin efficace contre l'entérite nécrotique représenterait un atout considérable pour l'industrie avicole afin de préserver le bien-être et la santé des cheptels, mais aussi de maintenir les performances de l'industrie avicole québécoise à un niveau optimal.

Chapitre 6 : Hypothèse et objectifs

Dans l'optique de répondre à cette problématique grandissante et aux inquiétudes des producteurs de poulets de chair au Canada, la présente étude vise à identifier de potentiels candidats vaccinaux. En ce sens, une approche par vaccinologie réverse comparative et soustractive des génomes de souches de *C. perfringens* d'origine aviaire permettra d'identifier des antigènes potentiels pour le développement d'un vaccin efficace contre l'entérite nécrotique. À cette fin, les objectifs de l'étude sont de i) décrire les génomes de *C. perfringens* d'origine aviaire de manière comparative, pour ensuite ii) décrire la composition protéique des souches virulentes et commensales de *C. perfringens*, puis finalement iii) d'identifier des antigènes de surface spécifiques aux souches capables de causer l'entérite nécrotique.

***Manuscrit en préparation pour le journal BMC Genomics:
Comparative genomics reveals great diversity in Clostridium
perfringens genomes of avian origin***

Ilhem Meniaï, Alexandre Thibodeau, Sylvain Quessy, Philippe Fravalo, Valeria R. Parreira & Marie-Lou Gaucher

Abstract

Background: *Clostridium perfringens* is a pathogen with global economical importance, majorly in the poultry industry where it is the main causative agent of necrotic enteritis in broiler chickens. This gram-positive anaerobe bacteria is found both in the environment and in the gut microbiota of different species. The pathogenicity of *C. perfringens* is multifactorial and has been the focus of various studies in recent years. Genomic analyses shed light on the different toxin genes present in this pathogen and their chromosomal or plasmidic origin. However, few studies showed a more comprehensive genomic comparison between a large selection of strains.

Results: In this study, 48 *C. perfringens* genomes isolated from healthy and diseased broiler chicken flocks were analysed *in silico* to explore their composition in plasmids, phage regions, protein-encoding genes and antimicrobial resistance genes. General sequencing results are as expected in terms of length, GC% and number of coding regions. The 155 700 proteins encoded in the 48 genomes were classified as 13% extracellular, 65% cytoplasmatic and 22% membrane-bound proteins. With a 90% similarity threshold, core genome of 48 strains was composed of less than 20% of total genes. Most plasmid components showed hits to various known plasmids, such as pJIR3537 and pCW3 and were mostly associated with resistance to lincomycin and tetracycline, which is comparable to results obtained from antibiotic resistance gene presence analysis among the 48 genomes. From 1 to 9 phage or prophage sequences were observed per genome, for a total of 24 different phages or prophages regions, where CP51, ϕ SM101 and ϕ 3626 were the most abundant.

Conclusions: Results of this study show the great genomic diversity between strains and the importance of continued research in order to understand and determine a full pathogenicity profile of *Clostridium perfringens* strains.

Keywords

Poultry, *Clostridium perfringens*, Wgs, Comparative Genomics

Background

In recent years, the poultry industry has been affected with outbreaks of necrotic enteritis (NE), causing major economic losses estimated to billions of dollars worldwide [1]. Reductions and bans on the use of antimicrobials in the feed have led to an increase in the occurrence of the disease, which led research towards novel prevention and treatment methods. Although the disease is multifactorial, NetB positive strains of *Clostridium perfringens* have been identified as the main pathological agent of necrotic enteritis in broiler chickens [2][3]. This gram-positive anaerobe and spore-forming bacteria is found commonly in soil, sewage and food, but also in the intestinal microbiota of healthy and diseased flocks. Seven types of *C. perfringens* are now considered, from A to G according to the toxin(s) they encode (Rood et al. 2018). In this new typing scheme, strains carrying the NetB toxin and causing NE are classified as *C. perfringens* type G. The full virulence profile of such strains is still to be determined, although previous studies provided more knowledge on pathogenesis, mainly regarding toxin production and mobile elements.

Virulence factors including toxins and antimicrobial proteins have been identified on different plasmids in the genomes of *C. perfringens* (Freedman et al. 2015). In the case of NE-causing strains, the plasmid-encoding NetB toxin was identified on a large pathogenicity locus, which also carries other potential virulence factors, such as adhesins, chitinases and tetracycline resistance genes. This locus is one of three pathogenicity loci of *Clostridium perfringens* (NE-loc-1, 2 and 3), of which two are located on *tcp* conjugative plasmids and one is chromosomal (Lepp et al. 2010). Furthermore, NE-loc1 was associated to the pathogenicity of the bacteria due to its apparent absence in avirulent strains (Lepp, 2010). Although these loci are well conserved amongst *C. perfringens* strains, recent research confirms the overall great diversity of this pathogen thus identifying novel virulence factors or genomic elements remains a priority.

Therefore, genomic analysis of this pathogen is essential for understanding the different elements and mechanisms involved in its pathogenesis. In fact, a 2018 report on *C. perfringens* was published in order to summarize knowledge about the bacteria but also to identify future research possibilities (Kiu & Hall. 2018). One of the main aspects discussed was to better define the *C. perfringens* genome in all its diversity. The aim of this study is therefore to provide further insight into the genomic composition of *C. perfringens* strains from healthy and diseased flocks. Different aspects such as protein composition, plasmids, phages and antibiotic resistance genes will be explored by in silico analysis of 48 strains of *C. perfringens*.

Results

Strains	NetB status	PFGE	Pilus profile	Genome Length (Mb)	Nb contigs	GC%	Nb CDS
MLG_7309	+	V1	1	3.46	245	28.16	3130
MLG_7009	+	V2	1	3.56	113	27.98	3253
MLG_1108	-	V3	1	3.53	127	27.99	3215
MLG_3309	+	V3	2	3.51	248	28.04	3184
MLG_3409	+	V3	1	3.53	107	27.98	3219
MLG_2010	+	V3	2	3.53	105	27.99	3214
MLG_2313	+	V3	9	3.53	113	27.99	3204
MLG_2114	-	V3	4	3.30	49	28.15	2920
MLG_7418	+	V3	2	3.53	101	27.99	3214
MLG_2514	-	V5	5	2.95	722	29.01	2539
MLG_1202	+	V5	8	3.73	195	27.97	3471
MLG_4201	+	V5	6	2.92	953	29.14	2455
MLG_7201	+	V5	5	3.03	719	28.88	2613
MLG_2516	+	V5	6	2.92	773	29.07	2468
MLG_2915	+	V5	10	3.08	672	28.8	2669
MLG_3215	-	V5	6	3.66	123	28.02	3429
MLG_7814	-	V6	5	3.66	172	28.02	3415
MLG_7820	+	V7	5	3.54	286	28.17	3262
MLG_2314	-	V10	11	3.29	42	28.09	2895
MLG_4914	+	V12	6	3.55	229	28.01	3230
MLG_5806	-	C1	6	3.32	25	28.12	2955
MLG_4206	-	C2	2	3.39	80	28.04	3025
MLG_3406	-	C2	7	3.39	82	28.05	3015
MLG_5213	+	C3	6	3.51	122	28	3196
MLG_0612	+	C3	6	3.51	91	27.98	3203
MLG_0712	+	C3	6	3.48	266	28.07	3135
MLG_7307	-	V1	12	3.63	145	28.57	3224
MLG_7407	-	V1	13	3.64	109	28.52	3257

MLG_7507	-	V1	14	3.65	58	28.49	3272
MLG_6907	-	V2	1	3.28	25	28.14	2916
MLG_7107	-	V2	1	3.28	43	28.14	2914
MLG_2203	-	V3	16	3.27	49	28.14	2872
MLG_2303	-	V3	17	3.28	24	28.13	2873
MLG_3519	-	V5	4	3.22	37	28.17	2860
MLG_1720	/	V6	6	3.69	513	28.79	3367
MLG_0919	-	V6	18	3.87	246	28.53	3577
MLG_5719	-	V7	1	3.37	74	28.21	3009
MLG_5219	-	V8	19	3.24	140	28.24	2868
MLG_5419	-	V8	1	3.36	151	28.15	2968
MLG_3119	-	C1	7	3.43	41	28.04	3044
MLG_2919	-	C1	20	3.43	34	28.04	3045
MLG_2719	-	C1	21	3.43	32	28.03	3044
MLG_2019	-	C2	3	3.22	88	28.18	2865
MLG_1819	-	C3	3	3.23	72	28.18	2870
MLG_1619	-	C3	22	3.26	69	28.17	2889
MLG_0418	+	C4	5	3.77	168	27.96	3534
MLG_0618	+	C4	8	3.75	215	27.99	3511
MLG_3111	+	C5	5	3.77	168	27.95	3536
AVERAGE				3.43	193	28.22	3080

Tableau II: Assembly statistics of *C. perfringens* genome

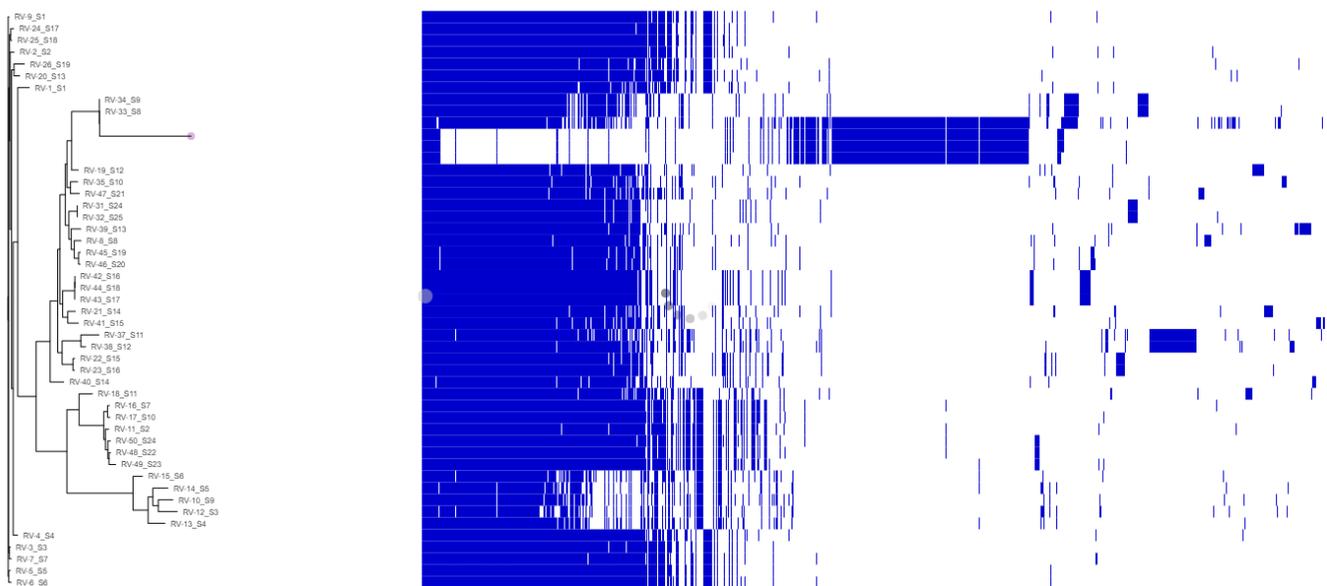
Data on strain profiles were acquired from a previous study (Gaucher *et al.* 2017). Of the 48 strains, 20 were NetB positive, 27 were negative and only one showed no result. A total of 22 different profiles were observed. All 48 poultry strains of *Clostridium perfringens* were assembled and annotated. The assembly statistics reveal an average of 193 contigs per genome, ranging from 24 to 245 contigs. As for genome length, values ranged between 2.92 and 3.77 Mb for an average of 3.43 Mb. *C. perfringens* genomes contained an average of 3080 coding regions with at least 2 455 CDS and 3 536 at most.

	Nb of genes	Total Genome %
Core	1 615	13%
Accessory	10 796	87%
Total genes	12 411	-
Unique genes	1 490	-

Tableau III: Genome composition of *C. perfringens* strains

In this study, the 48 genomes of *C. perfringens* show great diversity as the core genome has only been estimated to 1 615 genes, which represents 13% of the total number of genes. As illustrated in Fig1, it is important to point out that the farthest node to the right, including strains MLG_7303, MLG_7407 and MLG_7507, is much more diverse than the other strains. In fact, these three strains show a conserved region between them around the middle part of their genomic sequences.

Figure 2. – Pangenome analysis of 48 *Clostridium perfringens* strains



	Predicted localization			
	Extracellular	Cytoplasmic	Membrane	CellWall
MIN	290	1907	594	0
MAX	533	2421	822	1
AVERAGE	415	2109	720	-

Tableau IV: Protein subcellular localization

General statistics of protein localization are shown in table III. Results show that proteins are mostly predicted as cytoplasmic with an average of 2 109 proteins per genome, followed by an average of 720 predicted as part of the membrane, ranging from 594 to 822 proteins per genome. In a smaller proportion, extracellular proteins were present in 415 occasions on average per genome, with at most 533 and at a minimum of 290. Cell-wall prediction corresponds only to 1 protein overall.

	Average proteins per genome	Extracellular	Cytoplasmic	Membrane
Virulent	3188	406	2087	694
Non-virulent	3099	356	2032	711

Tableau V: Predicted subcellular localisation of proteins in *C. perfringens* genomes

Table V presents a comparison of predicted protein localization for virulent and non-virulent strains of this study. Overall, the total number of proteins differs by only 89 proteins. However, differences can be highlighted in the localization. Virulent strains seem to have higher numbers in extracellular and cytoplasmic proteins, but non-virulent strains seem to have more proteins as part of the membrane.

	Nb of components
average	9
max	36
min	1
	Occurrence
<10 components	36/48
>10 components	12/48

Tableau VI: Prediction of plasmid components in *C. perfringens* genomes

Best hits	Description
pJIR2774	lincosamide nucleoidyltransferase - Lincomycin resistance
pCW3 pDel1_4 pJIR3537 pFORC3 pCBA7123-01	Tetracycline resistance protein
pCPNY83906550-1 pCP13 pJFP55K pJFP838E	Cell-Wall binding protein Hypothetical protein Collagen adhesin
pIP404 SM101	Bacteriocin (uviAB)
pJFP55J pSM101	Resolvase
pLLY_N11-2 pCP15_2	Recombinase
NCTC13170 EHE-NE18 LLY_N11 NCTC2837	Facteur d'élongation Tu

Tableau VII: Description of predicted plasmid components in *C. perfringens* genomes

Resistance gene	Occurrence	Drug Class	Resistance mechanism
ANT(6)-Ib	1/48	aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation
mprF	47/48	peptide antibiotic	antibiotic target alteration
ErmB	2/48	streptogramin antibiotic; lincosamide antibiotic; macrolide antibiotic	antibiotic target alteration
ErmQ	1/48		
ErmT	7/48		
tet(W/N/W)	3/48	tetracycline antibiotic	antibiotic target protection and antibiotic efflux
tetA(P)	40/48		
tetB(P)	32/48		

Tableau VIII: Prediction of antibiotic resistance genes in *C. perfringens* genomes

AMR analysis revealed a resistance to tetracycline in 47 of the 48 *C. perfringens* strains. represented by genes tetA(P), tetB(P) and tet(W/N/W). In a same order of importance, 98% of strains show the presence on the multiple peptide resistance factor mprF. Other notable resistance genes found by the CARD Analysis Tool, namely ermB, ermT and ermQ, were related to the macrolide, lincosamide, streptogramin (MLS) group of resistance proteins.

Phage/prophage sequence	Occurrence
PHAGE_Clostr_vB_CpeS_CP51_NC_021325	33/48
PHAGE_Clostr_phiSM101_NC_008265	22/48
PHAGE_Clostr_phi3626_NC_003524	14/48
Unique	8/48

Tableau IX: Prediction of most common phages or prophages regions in *C. perfringens*

Analysis of prophage presence within *C. perfringens* genomes revealed a great diversity amongst the 48 strains. With the PHASTER online tool, 24 different phage sequences were identified of which 8 were found only once. Also, of those 8 unique prophage-like sequences, 3 of them belonged to a same strain, MLG_2516. Despite this diversity, 33 of the 48 strains of the study contained the same prophage-like sequence: CP51. Another common sequence belonged to the prophage ϕ SM101, with its presence in 22 strains. The third most common phage is ϕ 3626 with an occurrence of 29%. Interesting results with various hit scores include prophage-like sequences belonging to other bacterial species such as *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Prochlorococcus*, *Gordonia* and *Enterococcus*.

Discussion

Exploring the genome of *Clostridium perfringens*, the main causative agent of necrotic enteritis in broiler chickens, is a key step in understanding the pathogenesis of the disease. Previous authors have already stress out the need to focus on the contents of *C. perfringens* genomes, other than known toxins and virulence factors (Prescott, 2016) (Kiu & Hall, 2018). This present study was able to show the diversity in genomic composition of 48 strains collected from healthy and flock experiencing NE, based on comparative genomics.

Genome statistics

All 48 strains of the study were assembled *de novo* and annotated. Average genome length and GC% had standard values compares to published genomes available on the NCBI database. In fact, genome length of all 133 assemblies of *C. perfringens* available in the NCBI database is on average 3.47 Mb with an average of 28% in GC content. Results of this study showed an average length of 3.49 Mb and a GC% of 28.2%. As for annotation, the 49 strains of the study had an average of 3128 CDS, compared to an average protein count of 2975 for published genome assemblies. However, it is to be noted that a single strain in the study had a genome length of 6.42 Mb and 5464 coding regions, therefore increasing the total average. This strain was not lconsidered for further analysis.

Pangenome analysis

Based on other studies with a similar analysis, *C. perfringens* pangenome is hard to define at a high identity score between strains. Kiu et al. (2017) as well as Lacey et al. (2018) presented a pangenome analysis with a threshlod set at 95% of identity . In the present study, a first attempt using 99% of similarity revealed that 163 of total genes were part of the core genome, which doesn't compare to what was known of *C. perfringens*. With a manual inspection of results, it was concluded that the high number of accessory genes compared to unique genes was due to few differences in sequence for certain genes. This would classify a gene as unique, more than once, which would inflate the number of unique genes in a collection of genomes. From these conclusions, a decrease in the percentage of isolates for a gene must be in to be core genome (99% to 90%) was tested and results then showed a core genome of 1615 genes, which is much closer to the previously reported . These results and those of previous studies (Kiu & Hall, 2018; Lacey et al. 2018) show that this pathogen has a very diverse genome, as shown in Fig1, with a core representing less than 20% of the total genome. As *Clostridium perfringens* has many different niches, its genetic composition can therefore vary according to host, environment and bacterial interactions. Also, the high number of genes in the accessory genome proves the importance of studying this part of the genome as well as the core in order to identify novel virulence factors and better characterize the pathogenicity of the bacteria. Further investigation on the composition of core genes, accessory and unique genes would give a more extensive insight into *C. perfringens* genome diversity.

Protein localisation

One of the aims of this study was to better characterize in silico proteins present in *C. perfringens* genomes based on their predicted localisation. Since it has been widely reported that virulence factors of this pathogen are mostly associated with surface exposed proteins, efforts made in recent years regarding proteome analysis of *C. perfringens* were mainly to identify possible vaccine candidates located at the cell surface. These assumptions were based on the fact that several other gram-positive bacteria have an extracellular proteome associated with adhesion and inhibition of defense mechanisms in host cells, therefore contributing to pathogenesis (Segunpta et al., 2010). It was also reported that cytoplasmic proteins could have moonlighting properties which would allow them to play a role in virulence despite their localisation, hence the importance of analyzing all bacterial proteome and related functions (Jeffery, 2003). In fact, a complete portrait of protein localisation in *C. perfringens* genomes has never been fully documented. This study therefore presents predicted sub-cellular localisation of 155 700 proteins in a total of 48 annotated genomes. As results show, a majority of annotated sequences are predicted as cytoplasmic, which is expected, followed by close numbers of membrane and extracellular proteins. To further relate localisation to a possible virulence scheme, we clustered all proteins in two different groups corresponding to virulent and avirulent strains used in this study. Results show that on average, virulent strains tend to have more coding regions than avirulent strains with a higher number of extracellular proteins. Future investigation of the comparison of virulent and avirulent proteome could lead to novel identification of pathogenicity associated proteins.

Prophages sequences

Prediction of prophage regions in the genomes of this study revealed 24 different sequences. Most common prophages found were associated with *Clostridium perfringens*: CP51, ϕ 3626 and ϕ SM101. However, some sequences were associated, with low and high identity scores, with prophages identified in other bacteria, such as *Bacillus*.

Commonly designated vB_CpeS-CP51 prophage was first identified in *Clostridium perfringens* strain 5147-97 and suggested to be part of the *Siphoviridae* family (Gervasi et al. 2013). Within the 50 predicted ORFs, a role in sporulation seems to be the main function associated to this prophage. Results of this study, in correlation with previous ones, attest that prophage CP51 is

often observed in *C. perfringens* genomes. Furthermore, the same observation is made for prophage ϕ 3626 and a similar role in sporulation has been reported (Zimmer, Scherer and Loessner, 2002). However, phiSM101 has been identified in the genome of *C. perfringens* strain SM101, an enterotoxigenic type A strain. It was reported that all types of *C. perfringens* carried homologous genes to the *psm* gene of SM101, which could be a potential target for the control of this pathogen due to its cell-wall lytic activity. The level of activity of this enzyme is dependant on the strain, which could indicate a diversity in cell-wall composition (Nariya et al. 2011). The presence of this prophage region in the genomes of this study could be an indication of gene transfers between strains of different types.

In this study, two strains showed high identity scores for prophage sequences from other bacteria than *C. perfringens*. In fact, these sequences were identified as prophages GBK2, ϕ 4B1 and BhaS-171, all from the *Siphoviridae* family in the order *Caudovirales*. GBK2 is a thermophilic bacteriophage identified in the genome of *Geobacillus kaustophilus* (Marks & Hamilton, 2014). To our knowledge, this integration in the *C. perfringens* genome has never been reported. However, this bacteriophage shows great similarities to phage SPP1 of *Bacillus subtilis* with many ORFs related to DNA replication and general metabolism functions (Marks & Hamilton, 2014). Previous studies showed the role of *Bacillus subtilis* in the inhibition of *C. perfringens* in poultry farms to prevent disease (La Ragione & Woodward, 2003) (Teo & Tan, 2005). Studying this potential integration in *C. perfringens* genomes and the genes related to this bacteriophage could give insight into new preventive methods to control the bacteria in broiler chicken associated diseases. As for prophages ϕ 4B1 (NC_028886) and BhaS-171 (NC_030904), both are integrated in *Bacillus subtilis* genome, but no further information is available on predicted functions or integration in other bacterial species (Akwhale et al. 2015; submitted Microorganisms, Leibniz Institute DSMZ) (Fouts et al. Unpublished).

As shown here and supported by other studies (Lacey et al. 2018) (Kiu et al. 2017), prophages regions in *C. perfringens* are majorly associated with the *Siphoviridae* family. However, prophage sequences are not present in similar numbers in all strains. In fact, in this study, each genome integrates from 1 up to 9 prophage regions. This further demonstrates the great diversity of *C. perfringens* genomes and the possibility of acquiring different genes that play a role in

pathogenicity based on integration events and potentially by horizontal gene transfers (Lacey et al. 2018).

Plasmid elements

Reports on mobile elements of *Clostridium perfringens* are diverse and mostly focused on plasmids carrying toxin genes. Despite conflicting results, this study shows a correspondence of mobile elements already reported and associated with antibiotic resistance. A plasmid component of one of the 48 strains of the study was identified as similar in sequence to the conjugative plasmid pJIR2774 from the *C. perfringens* strain 95-949 (DQ338473.1). More precisely, a resistance gene to lincomycin located on the tISCpe8 transposable element was identified. A previous study described for the first time the pJIR2774 plasmid and the resistance to lincomycin conferred by the *lnuP* gene (Lyras et al. 2009).

Furthermore, as reported, the most common resistance is to tetracycline. Results show that many plasmids from different strains were identified with high BLAST scores to sequences in the 48 genomes of the study, mainly pDel1_4, pJIR3537 and pCW3. In the context of necrotic enteritis, pCW3 and pJIR3537 have been associated with NE-causing strains of *C. perfringens*, providing respectively tetracycline resistance and carrying the NE-loc3 pathogenicity region (Lacey et al. 2015). Also, one strain showed similarities with different other strains for unidentified genes coding for cell-wall binding proteins, collagen adhesins and hypothetical proteins, which can all potentially be apart of the many virulence factors of *C. perfringens*.

Interestingly, in all strains analysed for their potential plasmid elements, one sequence region appeared distant from others. BLAST analysis revealed that this specific region corresponds to the elongation factor Tu (Ef-Tu), an antigenic protein of *Clostridium perfringens*, and its neighbouring genes (Lee et al. 2011). This 16 138 bp sequence is recurrent in the 48 genomes of this study, with minor variations in sequence. Also, GC% was at an average of 35,12%, which could explain why the software classified the sequence as a plasmid. GTPase activity is the main function associated to elongation factor Tu, it delivers aminoacylated tRNAs to the ribosome, which means that it plays a key role in protein translation (Kavaliauskas et al. 2018; Widjaja et al. 2017). However, studies suggested other possible function for this protein, such as adhesion to a wide range of molecules. In fact, it has been reported that Ef-Tu confers binding abilities to *Lactobacillus reuteri* to mucous

membranes (Widjaja et al. 2017). Due to these various moonlighting functions, it is suggested that Ef-Tu can be localised at the cell surface as well. It was identified on the surface of *S. aureus*, *M. hyopneumoniae* and *M. pneumoniae* (Widjaja et al. 2017). To our knowledge, moonlighting properties and cell surface presence of elongation factor Tu have not yet been reported in *C. perfringens* genomes. Further research on this G-protein is necessary in order to determine its multiple functions and its role in the pathogen's cellular mechanisms.

Antimicrobial resistance

Resistance to antibiotics by *Clostridium perfringens* has been documented over the years and said to be a multidrug resistance pathogen (Kiu et al. 2017). However, the complete resistance profile of *C. perfringens* remains to be explored. The main resistance reported is for tetracycline, discovered in the 60s and extensively reported in later studies. As shown by the results of the present study, this resistance is highly present in *C. perfringens* genomes, supporting previous reports. As previously mentioned, and as shown by the results of this study, resistance to tetracycline is conferred by mobile genetic elements in the genome of *C. perfringens* strains.

However, in this study, *mprF* was the most commonly found antimicrobial resistance gene amongst the 48 genomes. The multiple peptide resistance factor *mprF* was identified in *Staphylococcus aureus* and has been implicated in susceptibility of the bacteria to antibiotics such as vancomycin, gentamycin and more recently, daptomycin (Ernst & Peschel, 2011). MprF is an integral membrane enzyme that neutralizes the membrane surface and provides a resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs), therefore playing a key role in immune evasion systems (Ernst et al. 2009). This resistance factor was also reported in *C. perfringens*. A study by Kiu et al. (2017) reported that *mprF* was present in 100% of isolates, correlating the 97% identified in this study.

In a lesser extent, the presence of Erm genes (B, Q and T) were predicted in 10 out of 48 genomes. These genes are often associated to erythromycin and MLS resistance (macrolides, lincosamides and streptogramins). *ErmP* has been known to be the major gene responsible for erythromycin resistance, but it has been shown that it wasn't widely present in *C. perfringens* genomes (Rood & Cole, 1991). Other related *Erm* genes, such as *ermQ*, were later discovered, but also related to erythromycin resistance. Interestingly, *ermT* has never been reported in *C. perfringens*. The gene is located on a plasmid, incorporated in the genome of the *Streptococcus* genus (Varaldo, Montanari & Giovanetti, 2009). However, studies reported that plasmid pRW35, carrying the *ermT*

gene in *S. pyogenes*, has a great potential of dissemination (Woodbury et al. 2008; Varaldo, Montanari & Giovanetti, 2009) raising that *ermT* could have been acquired from another genus. Therefore, the presence of *C. perfringens* in a broad range of environments could make the bacteria susceptible to different plasmid transfers.

Finally, ANT(6)-Ib gene was only found in 1 of the 48 genomes, which is similar to the findings of a previous study on *C. perfringens* (Kiu et al. 2017) that reported . ANT(6)-Ib was identified in 2010 from the genome of *Campylobacter fetus* by sequence homology to aminoglycoside nucleotidyltransferase ANT(6)-I and because of resistance to streptomycin (Abril, Brodard and Perreten, 2010). The presence of this gene in the genome of *Clostridium perfringens* further demonstrates its wide range of antibiotic resistance determinants.

Conclusions

The impact of *Clostridium perfringens* in the poultry industry has been even more observed in recent years due to a massive reduction and ban of antibiotics usage leading to an increase incidence of necrotic enteritis.. Research on the genome composition of *C. perfringens* has been mainly focused on toxins and virulence factors that could explain the pathogenicity of this bacteria. In this study, genomic analysis was performed to better describe *C. perfringens* genomes and further demonstrate their the extend of their genetic diversity.

Pathogenicity of the bacteria can be attributed to many factors such as phage integrations, plasmids and resistance genes. Therefore, the study of the composition of those specific sequences could help distinguish virulent strains from avirulent strains and futther understand the pathogenicity of *C. perfringens* and provide potential targets for on-farm control.

Methods

Sample selection

Clostridium perfringens strains were isolated from fecal samples of commercial broiler chickens. Theses samples were recovered from farms participating in a drug-free program in a previous study (Gaucher et al. 2015). Broilers were both from healthy farms and from farms affected by necrotic enteritis. Initial and final sampling times were six months apart and during those times, no in-feed antibiotics were used.

Isolation and DNA extraction of Clostridium perfringens Strains

Sample manipulations preceding sequencing were carried out in a previous study by Gaucher et al. (2017). This includes isolation of the bacteria on Perfringens Agar Base media and confirmation by a CAMP test. DNA extraction followed the protocol described by Charlebois et al (2012).

Sequencing

Clostridium perfringens genomes were sequenced by a research group in Guelph, Ontario, Canada. Libraries were prepared with the Nextera™ XT DNA Library Prep kit as per Guidelines (Illumina, Doc# 15031942).

Bioinformatics analysis

The genomes of the 48 *Clostridium perfringens* ' strains were assembled using the INNUca pipeline (Machado et al. GitHub <https://github.com/B-UMMI/INNUca>). This workflow includes the major tools for whole genome assembly, namely FASTQC, Trimmomatic, Spades and Pilon, respectively for quality control of reads, general genome assembly and quality control of assembly. The pipeline was conducted with default parameters. QUAST software (Gurevich et al. 2013) was then used to retrieve genome assembly statistics. The annotation of the 48 assembled genomes of *C. perfringens* was performed using the RASTtk server, with the IRIS online platform v0.0.8 (Brettin et al. 2015).

The 48 annotated genomes of *C. perfringens* were then analyzed with different bioinformatics tools to provide further insight into the general structure and composition of the genomes. PHASTER (Arndt et al. 2016; Zhou et al. 2011) was used for the identification of prophage sequences in bacterial genomes. A prediction of antibio-resistance gene presence was performed by the online database CARD (Jia et al. 2017), for which default parameters were used. Plasmid prediction was performed with PlasmidSpades v3.8.0 (Antipov et al. 2016) with default parameters. As for the pangenome, Roary v3.11.2 (Page et al. 2015) was used with a threshold of 90% to determine the core genome of the 48 *C. perfringens* strains.

Manuscrit en préparation pour la revue Vaccine: Candidate antigenic proteins identified by reverse vaccinology in Clostridium perfringens genomes isolated from broiler chickens.

Ilhem Meniaï, Alexandre Thibodeau, Sylvain Quessy, Philippe Fravalo, Valeria R. Parreira & Marie-Lou Gaucher

Abstract

Avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* is a disease with a major economical impact, generating losses up to billions of dollars for the poultry industry worldwide. This disease is in emergence in broiler chicken flocks eliminating the use of antibiotics. To date, no alternative allows for the efficient prevention of NE and a control by a vaccinal strategy would be mostly prized. Comparative and subtractive reverse vaccinology identifying immunogenic bacterial surface proteins is one of the most promising methodologies for the rapid development of an efficient vaccine. A comparative genomic study was performed on 48 *C. perfringens* strains isolated from healthy broiler chickens and from broilers affected by necrotic enteritis. From this study, it was established that genomes were composed of 155 700 distinct proteins were 13% were extracellular, 65% were cytoplasmic and 22% were part of the membrane. The evaluation of the immunogenic potential of these proteins was established with the prediction software VaxiJen for which a 0.5 threshold score.. For the most part, proteins with the highest scores were associated to an extracellular localisation. The combination of immunogenicity score and localisation of analysed proteins led to the selection of 12 vaccinal candidate proteins that were mostly annotated as hypothetical proteins. A more in-depth characterization of these proteins would allow the evaluation of their true vaccine potential by assessing their interaction with the host's immune system, the discovery of their function and ultimately to evaluate their probable role in the pathogeny of necrotic enteritis.

KEYWORDS

Broiler chickens, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, reverse vaccinology, candidate proteins, vaccine

Background

After the 2014 report published by the WHO highlighting the serious issue of antimicrobial resistance and its threat on public health, various action plans were developed all over the world in order to control and regulate antimicrobial use (WHO, 2014). In Canada, an action plan aiming at creating and reinforcing surveillance of antimicrobial resistance in animals and humans, promoting responsible use of antimicrobials in both veterinary and human medicine, creating collaborations between industrial and agricultural partners and promoting research and innovation at a national and international scale was established (SC, 2014). As part of the initiatives undertaken by the food-producing animal industries, the Chicken Farmers of Canada are currently implementing its national antimicrobial use reduction strategy which main objective consists of eliminating the preventive use of the four categories of antimicrobials that are important to human health (CFC, 2014). In fact, since 2015 Canadian producers had to deal with the ban of the preventive use of antimicrobials from categories 1 and 2 (CFC, 2016).

As reported by the European Union countries following the voluntary ban of antibiotic growth promoters in 2006, this initiative is associated with the re-emergence of diseases that were kept under control with the routine use of antibiotics. Among those, necrotic enteritis (NE) is one of the biggest challenges associated with these new regulations in Canada and worldwide. Although different factors such as coccidiosis, the immune status of the birds and the diet can predispose broiler chicken flocks to NE, *Clostridium perfringens* has been identified as the main causative agent. This bacterium is ubiquitously found in the environment, as well as in the gut microbiota of all warm-blooded animals. Based on the carriage of various toxin genes, strains belonging to this bacterial species are classified into 7 toxinotypes from which. *C. perfringens* strains belonging to the type G are recognized to cause necrotic enteritis (Rood et al., 2018). Virulence has been mainly associated with alpha and NetB toxins for *C. perfringens* type G, but previous studies show that other virulence factors may play a key role in the pathogenicity of the bacteria. For example, three conserved loci associated with necrotic enteritis, NELoc-1, NELoc-2 and NELoc-3, were identified and their gene composition was described (Lepp et al., 2010).

NetB was found on the largest locus: NELoc-1 (Lepp et al., 2010). A study showed that in the absence of other NELoc-1 genes, NetB was not fully able to cause NE, suggesting that the other

genes may play a role in virulence (Zhou et al., 2017) and that the netB toxin might be present among commensal strains.

VR-10B is a locus found only in pathogenic strains of *C. perfringens* in poultry and has been described as a facilitator of adhesion to extracellular matrix by encoding proteins involved in gut colonization (Lacey et al., 2016; Lepp et al., 2013). Moreover, the bacteriocin perfrin was found to be encoded by most NE-causing strains, and not by other types of strains, and therefore was proposed as an explanation for the competitiveness and survival of virulent strains (Lacey et al., 2016; Timbermont et al., 2014). The variety of virulence factors and the potential for the discovery of new ones hidden in *C. perfringens* genomes highlight the need for continuous research of methods to control and prevent necrotic enteritis. Different methods have been used as an alternative to antimicrobials for the control of the bacteria in broiler chicken farms in order to prevent and treat NE, such as modification of the diet by the addition of probiotics, prebiotics and essential oils, phage therapy and vaccine administration. To date, none of these methods seem to efficiently prevent necrotic enteritis outbreaks compared to antimicrobials.

However, in recent years, the development of high-throughput sequencing technologies and computational methods in genomics allowed for the deeper analysis of genomic data in a wide array of applications. In the context of vaccine development, reverse vaccinology has been introduced as a new methodology for the identification of antigens. Reverse vaccinology allows for a rapid assessment of the antigenic potential of candidate proteins in pathogenic microorganisms by investigating their genome composition. Based on an *in silico* identification of proteins, the rapid screening of potential candidate proteins allows for a more efficient identification of vaccine candidates. This method was used in various studies and the first approved vaccine was for MenB in 2012.

Using reverse vaccinology, the aim of this study was to identify candidate proteins of *Clostridium perfringens* that could serve in the development of a vaccine against necrotic enteritis in poultry.

Methods

C. perfringens strain selection

Based on the results of a previous study (manuscript in preparation), a total of 16 out of a collection of 48 *C. perfringens* strains were selected based on criteria such as PFGE, pilus profile, toxinotyping and their capacity to cause NE. These 16 strains are composed of 10 strains identified as virulent and 6 strains identified as commensal. Virulence was established on an experimental infection model where the 6 strains of this study were tested. These strains were sequenced and their genomes used for the identification, by reverse vaccinology, of the most suitable proteins to be used for vaccination.

Assembly, annotation and genome statistics were performed using the INNUca assembly pipeline <https://github.com/B-UMMI/INNUca>, the RASTtk annotation tool <http://tutorial.theseed.org/services/docs/invocation/Iris/iris.html> and the QUAST quality assessment tool <http://quast.sourceforge.net/>, respectively. Proteins of the 16 strains selected for reverse vaccinology were characterized according to the following tools: As well as virulent strains, commensal strains were also isolated in birds from farms affected by necrotic enteritis. However, they were not described as clones of the strains causing the disease.

Protein localization

The protein sub-cellular localisation was investigated using the pSORTb <https://www.psort.org/psortb/>, CELLO <http://cello.life.nctu.edu.tw/>, Gpos-mPLoc <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gpos-multi/> and FUEL-mLoc <http://bioinfo.eie.polyu.edu.hk/FUEL-mLoc/> software and a consensus decision approach was used to assign a final localisation status to each protein. In the case of ambiguous results with two possible localisations, both results were considered for the subsequent steps of the analysis pipeline. The presence of transmembrane regions and signal peptides were predicted using TMHMM® <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> and SignalP® <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> software, respectively. In the absence of any signal peptide, the online software SecretomeP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/> was used in order to assess the possibility of an alternate secretion pathway. Finally, a general BLAST approach

was performed on the candidate proteins studied to identify similarities with known proteins of either *C. perfringens* or of any other bacteria.

Proteins Immunogenic Potential

Every protein of each of the 16 genomes analyzed was given an immunogenicity score using the VaxiJen® online software. <http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>. As recommended in the software guidelines, a threshold value of 0.5 was used to categorize the proteins as probable antigens or non-antigens. For each genome, all proteins were then sub-divided according to their VaxiJen® score to get a clearer view of the results. A chosen range of 0.2 was established in order to obtain four categories of immunogenic potential: 0.5-0.7, 0.7-0.9, 0.9-1.5, 1.5 and more. For each category, virulent strains were compared with one another in order to identify common proteins sharing the same identity and amino acid sequence. The presence of these common proteins was then assessed in the genomes of the 10 commensal strains to confirm their absence in those strains.

Final vaccinal candidate protein selection

The protein selection step was conducted and all candidate proteins were manually inspected to guarantee they all had an immunogenic score above the 0.5 threshold value and that their encoding amino acid sequence was showing 100% similarity among the analyzed virulent strains whereas this sequence was either absent or different in the commensal *C. perfringens* studied. As this study was conducted using *C. perfringens* strains from Canadian farms, more precisely from Quebec, the presence of candidate proteins identified was evaluated in other publicly available genomes.

Results

Type	Strain identification	NetB status	PFGE profile	Type IV pilus profile	Total genome length (Mb)	No. contigs	GC content %	No. CDS	
Virulent	MLG_2313	+	V3	9	3.53	113	27.99	3204	
	MLG_2514	-	V5	5	2.95	722	29.01	2539	
	MLG_1202	+	V5	8	3.73	195	27.97	3471	
	MLG_2915	+	V5	10	3.08	672	28.8	2669	
	MLG_7814	-	V6	5	3.66	172	28.02	3415	
	MLG_7820	+	V7	5	3.54	286	28.17	3262	
	Average					3.42	360	28.33	3093
Commensal	MLG_5806	-	C1	6	3.32	25	28.12	2955	
	MLG_4206	-	C2	2	3.39	80	28.04	3025	
	MLG_3406	-	C2	7	3.39	82	28.05	3015	
	MLG_5213	+	C3	6	3.51	122	28	3196	
	MLG_0612	+	C3	6	3.51	91	27.98	3203	
	MLG_3119	-	C1	7	3.43	41	28.04	3044	
	MLG_2919	-	C1	20	3.43	34	28.04	3045	
	MLG_2719	-	C1	21	3.43	32	28.03	3044	
	MLG_2019	-	C2	3	3.22	88	28.18	2865	
	MLG_1619	-	C3	22	3.26	69	28.17	2889	
	Average					3.39	66	28.07	3028

Tableau X: Virulent and commensal *C. perfringens* strains' profiles and genome assembly description

Table 10 presents the 16 strains analyzed in this study. Strain profiles vary according to the NetB status, the PFGE profile and the type IV pilus profile. Table 10 shows that six strains were carrying NetB, leaving 10 strains with a negative NetB profile. A total of seven different PFGE profiles and 12 type IV pilus profile show the diversity in strain profiles. Table I also presents a genome assembly description of the 16 strains. On average, results for length, GC% and the number of coding regions seem similar between virulent and commensal strains. However, genome assembly seems to have produced less contigs in average (66) for commensal strains compared to virulent strains (360).

Strain profile	Strain identification	Protein localisation			Total no. Of proteins
		Extracellular	Cytoplasmic	Membrane	
Virulent	MLG_2313	436	2157	758	3351
	MLG_2514	483	1988	594	3065
	MLG_1202	521	2343	782	3646
	MLG_2915	514	2086	655	3255
	MLG_7814	470	2312	774	3556
	MLG_7820	498	2235	732	3465
	AVERAGE	487	2187	716	3390
Commensal	MLG_5806	301	1979	722	3002
	MLG_4206	325	2043	718	3086
	MLG_3406	410	1989	692	3091
	MLG_5213	422	2154	768	3344
	MLG_0612	417	2151	760	3328
	MLG_3119	358	2031	704	3093
	MLG_2919	327	2045	720	3092
	MLG_2719	341	2028	725	3094
	MLG_2019	315	1978	623	2916
	MLG_1619	346	1922	676	2944
AVERAGE	356	2032	711	3099	

Tableau XI: Comparison of protein sub-cellular localisation predictions for virulent and commensal *C. perfringens* strains

Following the assembly and annotation of the 16 *C. perfringens* strains, sub-cellular localisation was predicted for the whole proteome of each strain. On average, for both profiles, the number of cytoplasmic proteins is the highest followed by membrane proteins and then extracellular proteins.

Strain profile	Strain identification	Vaxijen threshold value		Total no. of proteins/genome	Antigen prediction	No. of proteins for each immunogenic score category			
		Non antigen < 0,5	probable antigen > 0,5			[0,5-0,7]	[0,7-0,9]	[0,9-1,5]	> 1,5
Virulent	MLG_2313	2237	1114	3351	33,24%	879	192	42	0
	MLG_2514	2015	1050	3065	34,26%	812	182	54	2
	MLG_1202	2399	1247	3646	34,20%	979	210	56	2
	MLG_2915	2155	1100	3255	33,79%	845	190	64	1
	MLG_7814	2345	1211	3556	34,06%	955	199	55	2
	MLG_7820	2298	1167	3465	33,68%	906	202	56	3
	Average	2242	1148	3390	33,87%	896	196	55	2
Commensal	MLG_5806	2032	970	3002	32,31%	788	146	35	1
	MLG_4206	2076	1010	3086	32,73%	819	149	42	0
	MLG_3406	2081	1010	3091	32,68%	817	147	46	0
	MLG_5213	2238	1106	3344	33,07%	883	181	42	0
	MLG_0612	2229	1099	3328	33,02%	883	176	40	0
	MLG_3119	2119	974	3093	31,49%	786	149	40	0
	MLG_2919	2119	973	3092	31,47%	784	148	41	0
	MLG_2719	2121	973	3094	31,45%	783	149	41	0
	MLG_2019	1974	942	2916	32,30%	763	741	38	0
	MLG_1619	1997	947	2944	32,17%	771	137	39	0
Average	2099	1000	3099	32,27%	808	212	40	0,1	

Tableau XII: Immunogenic potential of all proteins in virulent and commensal genomes of *C. perfringens*

Prediction results in table 12 show the average percentage of proteins, based on the total number of proteins in each genome, predicted as antigenic with a score equal or superior to 0.5, and the number of proteins predicted as non-antigenic with a score inferior to 0.5. Although virulent strains have an average higher number of proteins (3390) than commensal strains (3099), both strain profiles have a higher predicted number of non-antigenic proteins (< 0.5). On average, virulent strains presented 1.6% more antigenic proteins than commensal strains. Table III also shows that the virulent strain profile is associated with more probable antigenic proteins with a higher immunogenic score.

Protein identity	Length (aa.)	Immunogenic Score	Predicted localisation	No. TM regions	Presence of signal peptide	SecretomeP Score
P264-1	87	1.5149	Ex/Cy	-	-	0.947
P509	168	0.8671	Ex	0	-	0.947
P384	127	0.7736	CM	3	-	0.964
Hypothetical	72	0.7463	Cy/Ex	-	-	0.879
P1074	357	0.7339	CW/Ex	1	0.753	0.934
P153	50	0.7228	Ex/CM	-	-	0.948
P1569	522	0.7208	CW/Me	2	0.836	0.937
P804	267	0.7131	Ex/CM	1	-	0.929
Hypothetical	117	0.600	Cy	0	-	0.082
P2091	696	0.6715	Me/CW	2	0.674	0.929
P561	186	0.634	Ex	0	-	0.929
P759	219	0.5258	Me/CW	1	0.626	0.856

Tableau XIII: Characteristics of selected vaccinal candidate proteins of *C. perfringens*. Predicted localisation is described as Ex: extracellular, Cy: cytoplasmic, M: membrane, CW: cell wall

Table 13 presents the final selected 10 protein candidates and their respective description. Immunogenic score and predicted localisation were the main selection criteria that lead to these 10 proteins. Localisation for these candidates often shows ambiguity between two predictions, as seen in table IV. Immunogenic scores vary between 0.529 and 1.515. Length also varies greatly between strains, from 87 amino acids up to 696 amino acids. As for the three last elements in the table, number of transmembrane regions, presence of a signal peptide and the alternative secretion pathway score, they allow for a further description of the strains.

Discussion

C. perfringens is the main causative agent of necrotic enteritis in poultry. Without the preventive use of antibiotics, this disease is jeopardizing the sustainability of the poultry industry, in addition to impacting the animal welfare. To date, alternatives to antimicrobials have not shown to be as efficient or conclusive as antibiotics for keeping NE under control. The identification of specific *C. perfringens* antigens that could contribute to the development of a protective immunity in broiler chickens will greatly lower the burden of this disease on flocks moving away from routine use of antibiotics. Using a reverse vaccinology approach, this study identified potential candidate proteins that could serve for the development of an effective vaccine against NE.

The methodology used was inspired by other similar studies on reverse vaccinology. As opposed to a conventional reverse vaccinology approach, the proposed methodology used a reverse selection process for the identification of the candidate proteins, using the predicted immunogenic score as a first step. The main idea behind this choice of method is to consider every protein for antigen prediction without prior selection based on other characteristics. Typically, proteins are first included or excluded from analysis based on their sub-cellular localisation assuming that identified antigens must be at the cell surface in order to be accessible to the immune system (Flower et al., 2010). However, a protein exclusion by localisation does not consider the diversity of sub-cellular localisation, including cellular organelles, and the possibility of multifunctional proteins with different domains and various secretion pathways (Flower et al., 2010).

Such proteins are referred to as moonlighting proteins, which can have one or multiple roles such as cytokines, chaperones, adhesins as well as transmembrane channels (Henderson et al., 2011). It is therefore considered that moonlighting proteins can potentially be part of infection and virulence mechanisms, enhancing the importance of not dismissing them in vaccine target identification. For *C. perfringens*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) has been identified at its cell surface (Kulkarni et al. 2006; Matsunaga et al. 2018). This glycolytic enzyme was previously associated with adhesion and virulence in other bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* (Kulkarni et al., 2006). Its moonlighting properties include glycolytic activity, binding to fibronectin and to plasminogen. With the absence of a clear secretion signal or transmembrane regions, the presence of the protein at the surface of *C. perfringens* was explained by cell lysis, releasing GAPDH, which then binds to neighboring cells (Matsunaga et al., 2018).

This example of moonlighting activity shows that traditional methodology for reverse vaccinology would not select these proteins as candidates since they would be eliminated by only focusing on extracellular proteins in sub-cellular localisation prediction.

For an average of 3099 proteins per genome, the number of probable antigens is higher in virulent strains, which can be explained by the absence of mobile elements containing virulence factors in commensal strains (Lacey et al., 2018). Also, virulent genomes seem to have more immunogenic proteins above a 0.9 score. As for localisation, the complete profile shows a higher number of proteins in the six virulent strains compared to the ten commensal strains. Moreover, on average, virulent strains seem to have a higher number of extracellular proteins, which could indicate the presence of virulent factors at the cell surface and therefore a higher potential for specific vaccine targets (Flower et al., 2010).

Candidate protein description

The candidate protein P264-1, that was attributed the highest Vaxijen score (1.5149), was annotated as a hypothetical protein. This protein was present in five of the six virulent strains studied, without being identified from the genome sequence of all the commensal strains included in this study. The consensus approach used was not able to precisely localize this protein with certainty as a dual prediction (extracellular and cytoplasmic) was obtained. The absence of a signal peptide though, with a high score predicted by the SecretomeP software could indicate an alternative pathway of secretion for this protein and the presence of multifunctional domains within this protein could explain the ambiguity in the localisation prediction. A BLAST analysis of the sequence showed 100% similarity to a referenced hypothetical protein (WP_057231569) of *C. perfringens* and to other identical proteins from the publicly available genomes of Dell and CP4, also with a perfect sequence match. To our knowledge, no further information is available for this protein on its possible function and more particularly on its role in virulence.

The P1074 protein is an extracellular or membrane hypothetical protein of 357 amino acids and a score of 0.7339. Analysis showed that for this protein, the SecretomeP score should not be considered since the TMHMM and SignalP analysis revealed the presence of both a signal peptide and a transmembrane region. This protein was present in all the virulent strains analyzed in this study and as for P264-1 mentioned above, a 100% similarity level with a known protein (WP_057230739) of *C. perfringens* was found. This BLAST result is in accordance with a Pfam

search, which identified the sequence as part of the FctA family (PF12892), with its model protein Spy0128, a pilin protein of *Streptococcus. pyogenes* encoded by the pilin backbone gene *spy0128*. An experiment showed the role of *S. pyogenes* pilin in adherence to host cells and in the formation of biofilms, which suggests a role in pathogenesis of the bacteria (Manetti et al., 2007). Knowing its role, the protein selected in this study could potentially play a role in the adherence and colonisation ability of NE-causing *C. perfringens* during the initial stage of the disease. Colonization of *C. perfringens* requires adherence to damaged host's tissues. It has been reported that *C. perfringens* gets its advantage from binding to collagen, more specifically by the intermediate of surface-bound fibronectin (Hitsumoto et al., 2014).

Also identified in this study, the candidate protein P153 with a length of 50 amino acids and an immunogenic score of 0.7228 showed 100% similarity with a reported protein of *C. perfringens* (BAB80098.1). In the same way as for the candidate protein identified with the highest immunogenic score in the current study, the analysis of this protein showed an absence of any signal peptides or transmembrane regions, but a score above threshold for the SecretomeP prediction of an alternative secretion pathway. A literature search did not yield further information, particularly regarding function, potential role in virulence or immunogenic properties of this protein. As the sequence similarity of this protein with proteins previously identified in *C. perfringens* genomes such as CP15 and LLY_N11 which are all virulent strains implicated in necrotic enteritis studies.

P2091 is a hypothetical protein that was predicted as a cell-wall or as a membrane protein with an immunogenic score of 0.6715 and also chosen as a candidate for its potential role in virulence. In fact, a match with protein family PF05737 was found. This protein family is associated with collagen binding. A BLAST search confirms this result as the protein of this study matched various other genus' proteins, such as *Staphylococcus aureus*. These proteins were associated with the B-region of the Cna protein, which is a surface protein that mediates collagen binding (Deivanayagam et al., 2000).

Interestingly, in comparison with the protein with the highest immunogenic score (P264-1), which was absent from all commensals, three proteins described above were absent from all, except two, of the commensal *C. perfringens* strains analysed in the current study. Genetic similarities with known tested virulent strains could indicate sharing of genetic material. It could also be

hypothesized that identified virulent strains were more competitive therefore limiting the disease potential of other strains. During an NE episode, a dominant clone takes precedence on all others until the episode ends, which is followed by the reestablishment of the population diversity (Barbara et al., 2008). In that vein, even though these commensal strains were isolated from flocks affected by NE, they were not described as clones of the virulent strain identified in the disease outbreak but were representatives of the *C. perfringens* population diversity after the disease. It is therefore possible that the commensal strains genome studied are composed in part of virulence factors in this study, which could contribute to a competitive advantage. However, NE being a multifactorial disease, other virulence factors, such as NetB and other factors present on mobile elements, are necessary and their absence in the commensal strains could explain why these strains possess some of the candidate proteins identified in this study without being associated as causative strains of necrotic enteritis (Zhou et al., 2017). This is also why these proteins were kept as candidate. Further investigation on these commensal strains could include an NE test model to verify our hypothesis.

Two additional hypothetical proteins, P509 and P561, were selected for their extracellular localisation, their immunogenic score above 0.6 and their function is suspected to be important for virulence. Using a BLAST search approach on the sequences encoding both of those candidate proteins, the analysis revealed a 100% similarity level with known *C. perfringens* prepilin-type N-terminal cleavage and methylation domains proteins. In accordance with this result, both proteins were associated with the N-Methyl protein family PF07963. This family is known for its short motif and its role in the methylation of the phenylalanine residue at the N-terminal domain of the pilin proteins. It was reported to be found as part of the toxin-coregulated pilus subunit TcpA. This protein was identified in pathogenic *Vibrio Cholerae* and constitutes one of its major virulence factors as it is associated to colonization (Faruque et al., 2003). Both proteins were found with a 100% sequence match to some of the virulent strains. The exact sequence of the hypothetical protein P509 was found in five of the six virulent strains and absent in all ten commensal strains. However, it was then found with a lesser identity percentage in all strains. Similarly, for the other hypothetical protein's sequence P561, it was found in three of the six virulent strains and none of the commensals. It was also then found in all strains in different copies and different identity scores, which shows the variability in sequence between strain profiles. The absence from certain virulent

strains could be explained by the variability of genome sequencing and assembly quality, as presented in table I, and the accuracy of annotation for a partly assembled genome.

Conclusion

In a context of growing number of disease occurrences due to the ban of most antimicrobials and growth promoters, the search for alternative control methods is crucial. The aim of this study was to identify by *in silico* analysis candidate proteins for the development of a vaccine against NE-causing strains of *Clostridium perfringens*. Immunogenic score, localisation of proteins, and presence in virulent strains were the main characteristics for selection of proteins. Based on those factors, 12 candidate proteins were identified. Candidates of higher interest showed associations to known proteins and protein families in other bacterial genomes, for which host cell colonization was the major role identified. Further investigation on the proteins of this study could shed light on their function, their true antigenic potential and how they interact with the host immune system, potentially giving a more complete portrait of the diversity in virulence factors and pathogenicity of *Clostridium perfringens* strains.

Discussion générale

Mise en contexte

L'utilisation des agents antimicrobiens est, depuis leur découverte, un moyen incontournable de lutte contre les maladies infectieuses, aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Cependant, leur utilisation de manière excessive et sur de longues durées s'est soldée par l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques. C'est pourquoi, depuis une vingtaine d'années, plusieurs mesures restrictives ont été adoptées dans le but de bannir ou diminuer l'utilisation de certains antibiotiques, tels que ceux utilisés comme promoteurs de croissance chez les animaux de consommation. Pour l'industrie avicole, ces changements de régimes ont été accompagnés par la réémergence de certaines maladies, dont l'entérite nécrotique, habituellement contrôlées par l'usage d'antimicrobiens. Sans l'utilisation préventive d'antibiotiques, cette maladie met en danger la pérennité de l'industrie de la volaille, en plus d'avoir un impact considérable sur le bien-être animal. À ce jour, les alternatives aux antibiotiques proposées ne se sont pas révélées aussi efficaces ou concluantes que les antibiotiques pour prévenir et contrôler l'entérite nécrotique.

C. perfringens est le principal agent responsable de l'entérite nécrotique chez la volaille. L'identification d'antigènes spécifiques aux souches de *C. perfringens* capables de causer la maladie pourrait contribuer au développement d'un vaccin efficace pouvant prévenir la maladie dans des élevages de poulets de chair ayant mis fin à l'utilisation systématique des antibiotiques. En utilisant une approche par vaccinologie réverse comparative et soustractive, cette étude a permis d'identifier des protéines candidates potentielles pour le développement d'un tel vaccin. De plus, cette étude a pu montrer la diversité de la composition génomique de 48 souches de *C. perfringens* isolées de poulets de chair ayant été touchés ou non par l'entérite nécrotique, sur la base de la génomique comparative.

Diversité génomique des souches de *C. perfringens*

À ce jour, la recherche portant sur la composition du génome de *C. perfringens* et l'étude de ces facteurs de virulence s'est principalement concentrée sur les toxines et autres facteurs pouvant contribuer à la pathogénicité de cette bactérie. En effet, cette pathogénicité peut entre autres être attribuée à de nombreux facteurs tels que des phages, des plasmides et des gènes de résistance aux

antibiotiques (Kiu et al., 2018). Par conséquent, l'étude de la composition de ces séquences spécifiques peut aider à distinguer les souches entre elles, qu'elles soient virulentes ou avirulentes, et à mieux comprendre la pathogénicité de *C. perfringens*. En outre, l'établissement de différences génomiques entre les souches pathogènes et les souches commensales donnerait des cibles potentielles pour la prévention et le traitement des maladies dans les élevages de volailles.

Dans cette étude, la comparaison des génomes des souches de *C. perfringens* s'est basée sur différents aspects, tant quantitatifs que qualitatifs. La présence de séquences prophages, l'identification de régions plasmidiques, la présence de gènes de résistance aux antimicrobiens, ainsi que le protéome ont été évalués et quantifiés pour chacune des 48 souches de *C. perfringens*. De plus, une analyse pangénomique a été effectuée dans le but d'obtenir un portrait global de la diversité des souches soumises à l'étude. Une comparaison préalable entre différents outils bio-informatiques a permis d'élaborer un protocole d'analyse complet. Le choix du logiciel d'assemblage INNUca s'explique par son flux de travail, permettant un assemblage complet : du nettoyage des séquences jusqu'à l'obtention du génome final. De la même manière, le logiciel d'annotation RASTtk v0.0.8 a été sélectionné pour sa rapidité d'utilisation grâce à sa plateforme en ligne IRIS et pour sa qualité d'annotation supérieure, comparativement à d'autres logiciels testés pour les génomes de *C. perfringens*.

Présence de prophages

Les prophages sont définis comme étant des intégrations d'ADN, sous forme chromosomique ou plasmidique, dans une cellule bactérienne hôte (Torres-Barcelo, 2018). Par l'analyse des séquences génomiques bactériennes, ces insertions peuvent être détectées et les prophages peuvent être identifiées (Gyles et al., 2014). Le logiciel PHASTER permet d'utiliser des données d'assemblage de génome sous forme de contigs et de les annoter selon la base de données intégrée, et ce en un temps considérablement plus rapide que d'autres logiciels (de Sousa et al., 2018). Tel que montré dans cette étude et soutenu par d'autres (Lacey et al., 2018) (Kiu et al., 2017), chez *C. perfringens*, la majorité des prophages identifiés appartiennent à la famille des *Siphoviridae*. Dans la présente étude, une analyse *in silico* des 48 génomes a révélé la présence de 24 séquences prophages différentes. Parmi celles-ci, trois sont communément retrouvées dans les génomes de *C. perfringens*, soit CP51, ϕ 3626 et ϕ SM101. Un rôle dans la sporulation a été associé à CP51 et ϕ 3626, lui donnant ainsi la capacité de survivre à des conditions extrêmes de température ou

d'appauvrissement en nutriments (Kiu et al., 2018). Il a été démontré que cette caractéristique est essentielle et joue un rôle majeur dans la transmission bactérienne entre différents environnements et différents hôtes, pouvant ainsi faciliter l'infection (Li et al., 2016). La présence du prophage PhiSM101, normalement associé à la souche entérotoxigène SM101 de *C. perfringens* est assez surprenante. Ce phage a été identifié dans le génome de la souche SM101, une souche entérotoxigène de *C. perfringens*, lors d'une étude sur la diversité génomique de *C. perfringens* (Myers et al., 2006). Il a ensuite été proposé que ce phage s'intègre dans le génome de la souche SM101 pour encoder le gène *psm*, présentant une activité lytique (Nariya et al., 2011). La présence de ce phage et des phages de d'autres espèces bactériennes dans les génomes de cette étude pourrait démontrer le transfert de gènes intra-espèce et inter-espèces (Lacey et al., 2016).

Le nombre d'intégrations dans la cellule hôte permet aussi d'augmenter la variabilité génétique chez *C. perfringens*. À différents niveaux de complétion de la séquence génomique, cette étude montre que chaque génome intègre de 1 à 9 régions identifiées comme prophages. Cela mène davantage à une variabilité génétique intra-espèce.

Plasmides et résistance aux antibiotiques

Un important facteur de diversité dans les génomes bactériens est la présence d'éléments mobiles, dont les plasmides (Lacey et al., 2018). Chez *C. perfringens*, ces éléments ont été la cible de nombreuses études, en raison entre autres, de leur diversité et de la présence de plusieurs facteurs de virulence clés, tels que les gènes codant pour des toxines et des gènes de résistance aux antibiotiques (Lacey et al., 2018; Parreira et al., 2012; Sayeed et al., 2007, 2010). Les plasmides pJIR2774, pJIR3537 et pCW3 ont été les plus identifiés dans les 48 génomes de la présente étude.

Le plasmide conjugatif pJIR2774, membre de la famille de plasmides présentant une résistance à la tétracycline, est le premier de celle-ci à ne pas être associé à une telle résistance (Lyras et al., 2009). Une analyse de la composition du plasmide indique la présence du gène *lnuP*, localisé sur l'élément transposable tISCpe8 (Lyras et al., 2009). Par comparaison il a été déterminé que cet élément transposable avait des similarités significatives avec un élément transposable connu chez *Streptococcus agalactiae* et responsable de la résistance à la lincomycine (Lyras et al., 2009). A contrario, malgré une similarité séquentielle avec le plasmide pJIR2774, le plasmide pCW3 est le prototype des plasmides codant pour la résistance à la tétracycline. Cette résistance est aussi présente sur le plasmide pJIR3537. Une des caractéristiques importantes de ces plasmides

conjugatifs est la présence du locus de conjugaison *tcp*, essentiel au transfert de gènes par conjugaison.

Le transfert horizontal de gènes implique le transfert d'ADN entre souches d'une même espèce ou entre espèces différentes, fournissant ainsi aux pathogènes un nouveau potentiel de fonctions variées (Lacey et al., 2017). Ce phénomène contribue au pouvoir adaptatif et évolutif des bactéries (Gyles et al., 2014). Celui-ci a donc une importance considérable en santé animale dû aux possibilités de transfert de gènes reliés à la résistance aux antibiotiques (Lacey et al., 2017). C'est d'ailleurs un des éléments ayant mené vers la mise en place de plans de surveillance de la résistance aux antimicrobiens et à l'élimination graduelle de leur utilisation (Lacey et al., 2017). Chez *C. perfringens* d'origine aviaire, il a été démontré que le transfert horizontal de gènes contribuerait à la pathogénicité acquise de certaines souches préalablement considérées non-virulentes (Lacey et al., 2018). En effet, les plasmides de virulence décrits jusqu'à présent chez les souches capables de causer l'entérite nécrotique pourraient être transférés, menant ainsi à l'émergence de nouvelles souches pathogènes, capables de causer la maladie. Chez *C. perfringens*, cette caractéristique a été observée en laboratoire (Lacey et al., 2018). Il n'est donc pas exclu que ces mêmes événements se produisent dans l'environnement d'élevage et dans le microbiote intestinal des poulets de chair (Gaucher et al., 2017; Lacey et al., 2018). Ceci fait donc du transfert de gènes un facteur influençant la diversité génétique, la pathogénicité et l'épidémiologie de *C. perfringens* (Lacey et al., 2017).

Pangénome des souches de *C. perfringens*

Comme *C. perfringens* a de nombreuses niches écologiques différentes, la composition de son génome peut donc varier en fonction de l'hôte, de l'environnement et des interactions bactériennes ayant lieu à l'intérieur de son microbiote d'accueil. De plus, le phénomène du transfert horizontal de gènes, qu'il soit observé par l'intégration de séquences prophages ou par l'insertion d'éléments génétiques mobiles, mène à l'augmentation de la diversité génétique des souches de *C. perfringens* (Del Tordello et al., 2017; Kiu et al., 2017; Lacey et al., 2018). Cet aspect a pu être confirmé par la présente étude, grâce à l'analyse pangénomique des 48 souches de *C. perfringens*. En effet, les résultats montrent que moins de 20% du génome total est conservé à travers les 48 souches. Ce résultat, supporté par d'autres études, indique donc que le génome cœur de *C. perfringens* ne représente qu'une faible proportion du génome entier, laissant donc place à un large génome accessoire (Kiu et al., 2017; Lacey et al., 2018). Cependant, la présente étude démontre que cette

variabilité est aussi observée pour des souches intimement reliées, c'est-à-dire provenant d'une même source d'isolement ou de sources similaires en termes d'environnement de provenance.

En outre, le nombre élevé de gènes faisant partie du génome accessoire prouve l'importance d'étudier et d'analyser cette portion génomique afin d'identifier de nouveaux facteurs de virulence et de mieux caractériser la pathogénicité des bactéries. Dans un contexte où le développement de vaccin est la cible de telles recherches, les antigènes identifiés à partir du génome accessoire pourraient se révéler d'autant plus intéressants puisqu'ils peuvent représenter des éléments de différenciation entre les souches virulentes et les souches commensales (Del Tordello et al., 2017). De manière plus spécifique à *C. perfringens*, la possibilité d'un changement de profil par l'acquisition de matériel génétique transformant des souches commensales en souches virulentes donne davantage d'arguments à l'étude du génome accessoire dans le but d'identifier de nouveaux facteurs de virulence et de nouvelles cibles potentielles pour le contrôle du pathogène (Del Tordello et al., 2017).

Protéome des souches de *C. perfringens*

L'un des objectifs de cette étude était de mieux caractériser les protéines présentes dans les génomes de *C. perfringens* en fonction de leur localisation prédite *in silico*. Comme il a été largement rapporté que les facteurs de virulence de ce pathogène sont principalement associés aux toxines, puis récemment aux protéines de surface et les efforts déployés ces dernières années concernant l'analyse du protéome de *C. perfringens* ont principalement consisté à identifier d'éventuels candidats vaccinaux situés à la surface des cellules, comme rapporté chez d'autres bactéries gram-positives (Barinov et al., 2009; Kulkarni et al., 2006). En fait, un portrait complet de la localisation des protéines dans les génomes de *C. perfringens* n'a jamais été entièrement documenté. Cette étude décrit donc la localisation cellulaire prévue pour les quelques 155 700 protéines retrouvées dans les 48 génomes annotés. Les résultats indiquent, en moyenne pour chaque génome, la présence d'une majorité de séquences annotées prédites comme étant cytoplasmiques (2109), suivi par une moyenne de 720 protéines membranaires et de 415 protéines extracellulaires. Pour relier davantage la localisation à un schéma de virulence possible, toutes les protéines ont été classées en deux groupes différents, correspondant à celles retrouvées soit dans les souches virulentes ou avirulentes de cette étude. Les résultats montrent qu'en moyenne, les souches virulentes ont tendance à avoir plus de régions codantes que les souches avirulentes, avec un nombre plus élevé de protéines

extracellulaires, ce qui est en accord avec la littérature quant à la présence de facteurs de virulence à la surface cellulaire associés aux souches virulentes (Scott et al., 2006).

En effet, différentes études ont conclu que *C. perfringens* et plusieurs autres bactéries gram-positives ont un protéome extracellulaire associé à l'adhésion et à l'inhibition des mécanismes de défense dans les cellules hôtes, contribuant ainsi à la pathogenèse de maladies attribuables à ce pathogène (Prescott et al., 2016; Sengupta et al., 2010). Cependant, il a également été signalé que certaines protéines de ce protéome extracellulaire pouvaient avoir plus d'une fonction biologique. Ces protéines, surnommées *moonlighting proteins*, ont souvent deux ou plusieurs fonctions différentes et indépendantes les unes des autres (Henderson et al., 2011; Khan et al., 2016). À ce jour, plusieurs de ces protéines ont été répertoriées chez différentes espèces bactériennes et la plupart ont été associées à des fonctions intervenant dans les mécanismes de virulence, d'où l'importance de mieux les identifier et les caractériser (Henderson et al., 2011). L'activité enzymatique dans différentes voies métaboliques, l'activité de molécules chaperonnes, ainsi que l'activité catalytique du repliement des protéines sont parmi les principales fonctions reconnues de ces protéines (Henderson et al., 2011). Au niveau de la virulence, les fonctions majeures de ces protéines sont liées à l'adhésion et la modulation de l'activité des leucocytes (Henderson et al., 2011). Un important sous-groupe de ces *moonlighting proteins* sont celles ayant une activité chaperonne cytoplasmique, mais présentant des fonctions enzymatiques à la surface cellulaire. De ce fait, plusieurs de ces protéines sont associées à la virulence des bactéries, notamment dû à leurs rôles dans l'infection, l'invasion, la formation de biofilms et l'adhésion (Jeffery, 2018). Les protéines identifiées de ce sous-groupe sont notamment : des GAPDHs, des phosphoglycerate kinases, des enolases, des chaperonnes, telles que HSP60 et HSP70, et finalement, le facteur d'élongation Tu (Ef-Tu) (Jeffery, 2018).

Le facteur d'élongation Tu a précédemment été identifié en tant que *moonlighting protein* chez plusieurs espèces bactériennes, telles que *S. aureus* et *M. pneumoniae* (Jeffery, 2018; Widjaja et al., 2017). En se référant à la base de données répertoriant les protéines multifonctionnelles (MoonProt), le facteur d'élongation Ef-Tu est associé à deux fonctions différentes, soit la synthèse protéique et l'adhésion, pour lesquelles la localisation du facteur s'est avérée être cytoplasmique et extracellulaire (Jeffery, 2018; Widjaja et al., 2017). Dans cette étude, le facteur d'élongation Ef-Tu a d'abord été identifié comme séquence plasmidique par le logiciel PlasmidSpades, dû au

pourcentage élevé du contenu en GC de la séquence. En effet, puisque *C. perfringens* a en moyenne un contenu en GC d'environ 28% et que la séquence identifiée du Ef-Tu a montré un contenu de 35%, l'analyse *in silico* des éléments mobiles le plaçait parmi ceux-ci. À notre connaissance, des propriétés multifonctionnelles et la présence à la surface cellulaire du facteur d'élongation Tu n'ont pas encore été rapportées pour *C. perfringens*. Vu les possibles fonctions d'adhésion, il serait d'autant plus intéressant d'évaluer le rôle de cette protéine dans la virulence de *C. perfringens*.

Vaccinologie réverse

Dans la présente étude, l'approche par vaccinologie réverse a pris en compte tous les éléments précédemment discutés dans le but d'identifier des protéines candidates vaccinales chez *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique aviaire. Contrairement à une approche conventionnelle de la vaccinologie réverse, la méthodologie proposée ici utilise un processus de sélection inverse, où le score immunogène prédit pour chaque protéine est utilisé comme première étape pour filtrer les candidates. En effet, de manière générale, les protéines sont d'abord incluses ou exclues de l'analyse en fonction de leur localisation cellulaire, en supposant que les antigènes identifiés doivent être à la surface des cellules pour être accessibles au système immunitaire (Flower, Macdonald, Ramakrishnan, Davies et Doytchinova, 2010). Cependant, une exclusion de protéines par localisation ne prend pas en compte la possibilité de protéines multifonctionnelles avec différents domaines et différentes voies de sécrétion (Flower et al., 2010). Tel que mentionné précédemment, des *moonlighting proteins* peuvent potentiellement faire partie des mécanismes d'infection et de virulence, renforçant ainsi l'importance de les considérer dans l'identification des cibles vaccinales (Jeffery, 2018). Par exemple, chez *C. perfringens*, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été identifiée à la surface cellulaire (Kulkarni et al., 2006; Matsunaga et al., 2018). Cette enzyme glycolytique est associée à l'adhésion et à la virulence chez plusieurs bactéries, telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (Kulkarni et al., 2006). Ses propriétés de protéine multifonctionnelle incluent l'activité glycolytique, la liaison à la fibronectine et au plasminogène. En l'absence d'un signal de sécrétion ou de régions transmembranaires, la présence de la protéine à la surface de *C. perfringens* a été expliquée par la lyse cellulaire, libérant la GAPDH qui se lie ensuite aux cellules voisines (Matsunaga et al., 2018). Cet exemple d'activité de *moonlighting* montre que la méthodologie traditionnelle de la vaccinologie réverse ne sélectionnerait pas ces protéines comme candidates, dû à l'exclusion des protéines normalement

localisées dans le cytoplasme et l'inclusion unique des protéines prédites comme extracellulaires. De ce fait, sans d'abord tenir compte de la localisation, le score d'immunogénicité attribué par le logiciel VaxiJen v2.0 a permis d'avoir un aperçu du contenu antigénique dans les génomes des souches de *C. perfringens* considérées dans cette étude, puis d'exclure par la suite certaines protéines sous le seuil de probabilité, constituant ainsi la première étape de sélection de l'approche par vaccinologie réverse employée dans la présente étude.

Les résultats ont montré que, pour une moyenne de 3099 protéines par génome, le nombre d'antigènes probables était plus élevé dans les souches virulentes. Ceci, peut s'expliquer entre autres par l'absence d'éléments mobiles contenant des facteurs de virulence dans les souches commensales (Lacey et al., 2018). De plus, en moyenne, les souches virulentes semblaient posséder un nombre plus élevé de protéines extracellulaires, ce qui pourrait indiquer la présence de facteurs virulents à la surface cellulaire et donc un potentiel plus élevé pour l'identification de cibles vaccinales spécifiques à ces souches pathogènes (Flower et al., 2010).

L'approche par vaccinologie réverse utilisée dans la présente étude se voulait soustractive et comparative, ce qui implique une comparaison entre souches virulentes et commensales afin de ne retenir que les protéines uniques aux souches virulentes, suivie d'une comparaison entre souches virulentes pour ne retenir que les protéines communes. Ainsi, la portion soustractive de la méthodologie garantit une présence unique des protéines candidates dans les génomes de souches virulentes et une absence dans les génomes des souches commensales. Basé sur ces critères, cette sélection protéique a mené à l'identification de 10 protéines candidates vaccinales.

Malgré l'évaluation du potentiel immunogène de toutes les protéines, sans égards à leur localisation cellulaire, les protéines candidates retenues étaient soit membranaires, soit extracellulaires. Ce choix de sélection suit un protocole standard de vaccinologie réverse. En effet, la probabilité de retrouver des antigènes protecteurs et ayant un rôle dans la virulence de *C. perfringens* est plus élevée au niveau de la surface cellulaire (Del Tordello et al., 2017; Kaushik et al., 2008). D'ailleurs, il a été suggéré que les candidats protéiques à considérer pour le développement d'un vaccin protecteur sont ceux ayant un rôle dans les premières étapes de la pathogénie d'une maladie (Del Tordello et al., 2017). Ainsi, pour l'entérite nécrotique, l'adhésion de *C. perfringens* à la paroi intestinale serait une étape initiale clé dans le développement de la maladie (Prescott et al., 2016). En effet, les protéines de la matrice extracellulaire seraient exposées suite aux dommages causés à

la paroi cellulaire par la toxine NetB et constitueraient la cible des adhésines, facilitant donc l'adhésion du pathogène (Prescott et al., 2016). D'ailleurs, un des loci de pathogénicité de *C. perfringens*, NELoc-1, contient une grande proportion de gènes codant pour des protéines de surface prédites comme adhésines (Lepp et al., 2010; Prescott et al., 2016). De ce fait, l'adhésion de la bactérie à son hôte est une étape cible et les adhésines à la surface cellulaire sont donc des candidats vaccinaux prometteurs (Del Tordello et al., 2017).

Description des protéines candidates

En accord avec les hypothèses du rôle important des adhésines dans la virulence de *C. perfringens* et l'importance de cibler les facteurs d'adhésion et de colonisation de ce pathogène pour le développement de stratégies de contrôle, certaines des protéines identifiées dans la présente étude pourraient s'avérer être de potentiels candidats entrant dans la composition d'un vaccin.

Les protéines P1074, P209, P509 et P561 ont toutes été annotées comme étant des protéines hypothétiques et leurs localisations ont été prédites comme étant extracellulaire ou membranaire. En plus d'un score d'immunogénicité supérieur au seuil recommandé la présence de ces protéines dans le génome de toutes les souches virulentes et leur absence des souches commensales de *C. perfringens* en font des cibles candidates intéressantes (Doytchinova et al., 2007).

Par une analyse de la famille protéique utilisant l'outil en ligne Pfam, la protéine P1074 a été associée à la famille FctA (PF12892). Cette famille a comme modèle la protéine Spy0128, une protéine piline de *Streptococcus pyogenes* codée par le gène *spy0128* (Manetti et al., 2007). La présence de pilines a été documentée chez plusieurs espèces de bactéries gram positives, dont *C. perfringens* (Lepp et al., 2013; Varga et al., 2006). Il s'agit de minces appendices à la surface cellulaire et leurs rôles sont liés, entre autres, à la motilité, l'adhésion et la formation de biofilms (Manetti et al., 2007; Piepenbrink et al., 2016). Il a aussi été démontré qu'une piline de *Streptococcus spp.* était encodée par l'îlot de pathogénicité FCT (*Fibronectin-binding, collagen-binding, T-antigen*) associé à la liaison à la fibronectine et au collagène (Manetti et al., 2007). Chez *C. perfringens*, Hitsumoto et ses collaborateurs ont aussi montré que ce pathogène tirait son avantage de la liaison au collagène, plus précisément par l'intermédiaire de la fibronectine liée à la surface (Hitsumoto et al., 2014). La protéine P1074 identifiée dans cette étude pourrait donc être liée aux fonctions des pilines et donc potentiellement impliquée dans la pathogénicité de la bactérie.

De la même manière, les protéines P509 et P561 ont été identifiées comme candidates. En utilisant une approche de recherche BLAST sur les séquences codant pour ces deux protéines candidates, l'analyse a révélé un niveau de similitude de 100% avec les domaines de clivage et de méthylation N-terminaux de type pré-piline de *C. perfringens* connus. Conformément à ce résultat, les deux protéines ont été associées à la famille de protéines N-méthyl PF07963. Cette famille est connue pour son motif court et son rôle dans la méthylation du résidu phénylalanine au domaine N-terminal des protéines pilines. Il a été rapporté qu'elle faisait partie de la sous-unité pilus TcpA à corégulation de toxines (Faruque et al., 2003). Cette protéine a été associée à des souches de *Vibrio cholerae* et constitue l'un des principaux facteurs de virulence de ce microorganisme en étant associée à sa capacité de colonisation (Faruque et al., 2003).

Finalement, la protéine P2091 a montré une concordance avec la famille PF05737, qui représente un domaine de liaison au collagène retrouvé chez plusieurs espèces bactériennes. Ce résultat a été confirmé par une recherche BLAST, entre autres par une similarité en séquence avec la région B de la protéine Cna, qui assure la liaison au collagène chez *Staphylococcus aureus* (Deivanayagam et al., 2000). De ce fait, puisque l'adhésion aux matrices protéiques extracellulaires telles que le collagène est un des premiers mécanismes impliqués dans la pathogénie de plusieurs infections (Deivanayagam et al., 2000), la protéine P2091 de cette étude a été sélectionnée comme candidate vaccinale. Chez *C. perfringens*, la protéine CnaA est aussi reconnue comme adhésine au collagène, encodée par le locus VR-10B, présents chez les souches pathogènes de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique aviaire (Lepp et al., 2013; Wade et al., 2016). Il a aussi été démontré que cinq des gènes, dont celui codant pour la protéine CnaA, sont exprimés en un opéron unique, appelé le locus d'adhérence au collagène (Wade et al., 2016). En l'absence d'expression de ce locus, la virulence d'une souche de *C. perfringens* a été complètement supprimée, alors qu'une autre souche en a vu sa virulence diminuée (Wade et al., 2016). Malgré le constat de l'importance de ce locus dans la colonisation et la virulence de *C. perfringens*, les résultats démontrent aussi la variabilité des souches quant à leur capacité à causer l'entérite nécrotique. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser l'adhérence, la colonisation et les protéines impliquées à ces étapes clés de la pathogénicité de la bactérie (Wade et al., 2016).

Observations

Dans cette étude, contrairement à la protéine P264-1 qui était absente de toutes les souches commensales, trois des protéines décrites ci-dessus, en lien avec l'adhésion et la colonisation, étaient présentes dans deux des 10 souches commensales de *C. perfringens* avec une similarité de 100% en séquence avec celles retrouvées chez les souches virulentes. Des similitudes génétiques avec des souches virulentes connues pourraient indiquer un partage de matériel génétique. En effet, le transfert de plasmides peut convertir des souches commensales en souches virulentes causant l'entérite nécrotique par le transfert de plasmides de virulence et l'acquisition de plasmides de résistance aux antibiotiques (Lacey et al., 2018). On pourrait également émettre l'hypothèse que les souches virulentes identifiées préalablement à la présente étude étaient plus compétitives, inhibant ainsi d'autres souches potentiellement virulentes présentes dans le même environnement. Au cours d'un épisode d'EN, un clone dominant a priorité sur tous les autres jusqu'à la fin de l'épisode, suivi du rétablissement de la diversité de la population (Barbara et al., 2008). Dans cette perspective des souches commensales ont pu être isolées d'élevages atteints d'EN sans qu'elles ne soient décrites comme des clones virulents, mais plutôt comme représentants de la diversité de la population de *C. perfringens* présente dans ces élevages après la maladie. Il est donc possible que dans la présente étude, les souches commensales possèdent certains facteurs de virulence pouvant contribuer à un avantage concurrentiel, mais que l'ensemble des facteurs de virulence décrits à ce jour et permettant aux souches virulentes de causer l'entérite nécrotique ne soit pas présents. Puisqu'il semble que des facteurs de virulence autres que *netB* soient nécessaires pour conférer la pleine virulence aux souches de *C. perfringens* capables de causer l'entérite nécrotique, leur absence dans les souches commensales pourrait expliquer pourquoi ces souches possèdent certaines des protéines candidates identifiées dans cette étude sans toutefois être identifiées comme responsables d'épisodes d'entérite nécrotique (Zhou et al., 2017). Une enquête plus approfondie sur ces souches commensales incluant entre autres l'utilisation d'un modèle d'infection expérimental pour l'entérite nécrotique permettrait de vérifier le potentiel virulent de celles-ci.

Conclusion générale

Les inquiétudes face à la réémergence de certaines maladies dû à l'abolition de l'utilisation des antibiotiques orientent la recherche vers des méthodes alternatives de prévention et de traitement. Tout en visant à identifier, par analyses bio-informatiques, des protéines candidates vaccinales contre les souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique aviaire, la présente étude a également démontré la variabilité génomique des souches de *C. perfringens* d'origine aviaire.

De manière plus spécifique, cette étude a permis :

- De constater la présence de multiples éléments génétiques contribuant à la diversité de ce pathogène ainsi qu'à sa virulence, tels que des plasmides, des prophages et des gènes de résistance aux antibiotiques.
- De tracer un portrait global du protéome de souches de *C. perfringens* d'origine aviaire au Québec, en accordant une importance à la localisation cellulaire des protéines bactériennes identifiées;
- D'identifier un total de 155 700 protéines parmi 48 génomes annotés de *C. perfringens* d'origine aviaire. En moyenne, chaque génome contient 415 protéines extracellulaires, 2109 protéines cytoplasmiques et 720 protéines membranaires;
- D'utiliser la vaccinologie réverse pour l'identification d'antigènes candidats dans les génomes de *C. perfringens* capables de causer l'entérite nécrotique aviaire;
- D'identifier 12 protéines candidates vaccinales;
- De constater que 4 protéines candidates sur 12 ont été décrites comme ayant un rôle probable dans l'adhésion.

Perspectives

Plusieurs axes de recherche peuvent constituer des avenues prometteuses pour faire suite à la présente étude. Dans la perspective de recherche dans un axe immunologique, l'évaluation du potentiel immunogène réel des protéines sera une étape clé puisqu'elle permettra de confirmer les résultats obtenus *in silico*. Il sera également intéressant d'évaluer la réponse immunitaire engendrée chez l'hôte lorsqu'exposé aux antigènes sélectionnés. Par ailleurs, la protéomique est un domaine à explorer davantage afin de mieux comprendre les facteurs de virulence de *C. perfringens* et ainsi les distinctions entre souches virulentes et commensales. De plus, il serait intéressant de donner suite à cette étude en décrivant davantage les protéines possédant des caractéristiques de protéines faisant du *moonlighting*. En effet, une meilleure description de la localisation de ces protéines et la prédiction d'une voie alternative de sécrétion, en approfondissant l'étude fonctionnelle de ces mêmes protéines permettrait d'en connaître davantage sur la contribution de celles-ci au pouvoir pathogène de *C. perfringens*. D'un point de vue microbiologique, une étude du microbiote intestinal des poulets non seulement à toutes les étapes d'un épisode d'entérite nécrotique, mais aussi lors de l'exposition à des antigènes candidats vaccinaux comme ceux identifiés dans la présente étude, en conditions d'infection expérimentale à l'entérite nécrotique ou pas, pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de *C. perfringens* et de ses facteurs de virulence sur la santé digestive aviaire. Finalement, il serait intéressant d'envisager l'utilisation d'autres approches, telles que la transcriptomique ou la méthode émergente de la protéomique structurale afin de non seulement confirmer les antigènes identifiés dans cette étude, mais aussi d'identifier d'autres candidats vaccinaux potentiels.

Références bibliographiques

- Antonissen, G., Eeckhaut, V., Van Driessche, K., Onrust, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., . . . Van Immerseel, F. (2016). Microbial shifts associated with necrotic enteritis. *Avian Pathol*, 45(3), 308-312. doi: 10.1080/03079457.2016.1152625
- ASPC. (2015). Plan d'action fédéral sur la résistance et le recours aux antimicrobiens au Canada: Prolongement du cadre d'action fédéral.
- ASPC. (2018). Rapport d'étape sur le plan d'action fédéral 2015 sur la résistance et le recours aux antimicrobiens.
- Barbara, A. J., Trinh, H. T., Glock, R. D. et Glenn Songer, J. (2008). Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol*, 126(4), 377-382. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.019
- Barinov, A., Loux, V., Hammani, A., Nicolas, P., Langella, P., Ehrlich, D., . . . van de Guchte, M. (2009). Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics*, 9(1), 61-73. doi: 10.1002/pmic.200800195
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P. et Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother*, 52(2), 159-161. doi: 10.1093/jac/dkg313
- CFC. (2014). Strategic Plan For The Canadian Chicken Industry.
- CFC. (2016). Next Steps for the Antimicrobial Use Strategy. *The Chicken Farmer*, 18(6).
- Chiang, M. H., Sung, W. C., Lien, S. P., Chen, Y. Z., Lo, A. F., Huang, J. H., . . . Chong, P. (2015). Identification of novel vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using reverse vaccinology. *Hum Vaccin Immunother*, 11(4), 1065-1073. doi: 10.1080/21645515.2015.1010910
- Contreras, M., Villar, M., Artigas-Jeronimo, S., Kornieieva, L., Msmall u, C. S. et de la Fuente, J. (2018). A reverse vaccinology approach to the identification and characterization of *Ctenocephalides felis* candidate protective antigens for the control of cat flea infestations. *Parasit Vectors*, 11(1), 43. doi: 10.1186/s13071-018-2618-x
- Craven, S. E., Cox, N. A., Bailey, J. S. et Cosby, D. E. (2003). Incidence and Tracking of *Clostridium perfringens* through an Integrated Broiler Chicken Operation. *Avian Diseases*, 47(4), 707-711.
- Cross, D. E., McDevitt, R. M., Hillman, K. et Acamovic, T. (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci*, 48(4), 496-506. doi: 10.1080/00071660701463221
- Crouch, C. F., Withanage, G. S., de Haas, V., Eto, F. et Francis, M. J. (2010). Safety and efficacy of a maternal vaccine for the passive protection of broiler chicks against necrotic enteritis. *Avian Pathol*, 39(6), 489-497. doi: 10.1080/03079457.2010.517513
- Dahiya, J. P., Wilkie, D. C., Van Kessel, A. G. et Drew, M. D. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology*, 129(1-2), 60-88. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.12.003

- de Sousa, A. L., Maues, D., Lobato, A., Franco, E. F., Pinheiro, K., Araujo, F., . . . Ramos, R. T. J. (2018). PhageWeb - Web Interface for Rapid Identification and Characterization of Prophages in Bacterial Genomes. *Front Genet*, 9, 644. doi: 10.3389/fgene.2018.00644
- Deivanayagam, C. C., Rich, R. L., Carson, M., Owens, R. T., Danthuluri, S., Bice, T., . . . Narayana, S. V. (2000). Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure*, 8(1), 67-78.
- Del Tordello, E., Rappuoli, R. et Delany, I. (2017). Reverse Vaccinology (*Human Vaccines* (p. 65-86).
- Delany, I., Rappuoli, R. et Seib, K. L. (2013). Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(5), a012476. doi: 10.1101/cshperspect.a012476
- Dellagostin, O. A., Grassmann, A. A., Rizzi, C., Schuch, R. A., Jorge, S., Oliveira, T. L., . . . Hartwig, D. D. (2017). Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *Int J Mol Sci*, 18(1). doi: 10.3390/ijms18010158
- Donati, C. et Rappuoli, R. (2013). Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design. *Ann N Y Acad Sci*, 1285, 115-132. doi: 10.1111/nyas.12046
- Donkor, E. S. (2013). Sequencing of bacterial genomes: principles and insights into pathogenesis and development of antibiotics. *Genes (Basel)*, 4(4), 556-572. doi: 10.3390/genes4040556
- Doytchinova, I. A. et Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8, 4. doi: 10.1186/1471-2105-8-4
- Dwivedi, P., Alam, S. I. et Tomar, R. S. (2016). Secretome, surfome and immunome: emerging approaches for the discovery of new vaccine candidates against bacterial infections. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(9), 155. doi: 10.1007/s11274-016-2107-3
- Faruque, S. M., Kamruzzaman, M., Meraj, I. M., Chowdhury, N., Nair, G. B., Sack, R. B., . . . Sack, D. A. (2003). Pathogenic potential of environmental *Vibrio cholerae* strains carrying genetic variants of the toxin-coregulated pilus pathogenicity island. *Infect Immun*, 71(2), 1020-1025. doi: 10.1128/iai.71.2.1020-1025.2003
- Flower, D. R., Macdonald, I. K., Ramakrishnan, K., Davies, M. N. et Doytchinova, I. A. (2010). Computer aided selection of candidate vaccine antigens. *Immunome Research*, 6(Suppl 2):S1.
- Gaucher, M. L., Perron, G. G., Arsenault, J., Letellier, A., Boulianne, M. et Quessy, S. (2017). Recurring Necrotic Enteritis Outbreaks in Commercial Broiler Chicken Flocks Strongly Influence Toxin Gene Carriage and Species Richness in the Resident *Clostridium perfringens* Population. *Front Microbiol*, 8, 881. doi: 10.3389/fmicb.2017.00881
- Gaucher, M. L., Quessy, S., Letellier, A., Arsenault, J. et Boulianne, M. (2015). Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poult Sci*, 94(8), 1791-1801. doi: 10.3382/ps/pev142
- Gyles, C. et Boerlin, P. (2014). Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol*, 51(2), 328-340. doi: 10.1177/0300985813511131

- Hasan, M., Ghosh, P. P., Azim, K. F., Mukta, S., Abir, R. A., Nahar, J. et Hasan Khan, M. M. (2019). Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope subunit vaccine against avian influenza A (H7N9) virus. *Microb Pathog*, 130, 19-37. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.023
- Henderson, B. et Martin, A. (2011). Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun*, 79(9), 3476-3491. doi: 10.1128/IAI.00179-11
- Hitsumoto, Y., Morita, N., Yamazoe, R., Tagomori, M., Yamasaki, T. et Katayama, S. (2014). Adhesive properties of *Clostridium perfringens* to extracellular matrix proteins collagens and fibronectin. *Anaerobe*, 25, 67-71. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.11.002
- Jeffery, C. J. (2018). Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 373(1738). doi: 10.1098/rstb.2016.0523
- Jorge, S. et Dellagostin, O. A. (2017). The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 6-13. doi: 10.1016/j.biori.2017.10.001
- Kaushik, D. K. et Sehgal, D. (2008). Developing antibacterial vaccines in genomics and proteomics era. *Scand J Immunol*, 67(6), 544-552. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02107.x
- Keyburn, A. L., Bannam, T. L., Moore, R. J. et Rood, J. I. (2010). NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins (Basel)*, 2(7), 1913-1927. doi: 10.3390/toxins2071913
- Keyburn, A. L., Boyce, J. D., Vaz, P., Bannam, T. L., Ford, M. E., Parker, D., . . . Moore, R. J. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog*, 4(2), e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0040026
- Keyburn, A. L., Portela, R. W., Sproat, K., Ford, M. E., Bannam, T. L., Yan, X., . . . Moore, R. J. (2013). Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Veterinary Research*, 44(54).
- Keyburn, A. L., Sheedy, S. A., Ford, M. E., Williamson, M. M., Awad, M. M., Rood, J. I. et Moore, R. J. (2006). Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun*, 74(11), 6496-6500. doi: 10.1128/IAI.00806-06
- Khan, I. K. et Kihara, D. (2016). Genome-scale prediction of moonlighting proteins using diverse protein association information. *Bioinformatics*, 32(15), 2281-2288. doi: 10.1093/bioinformatics/btw166
- Kiu, R., Caim, S., Alexander, S., Pachori, P. et Hall, L. J. (2017). Probing Genomic Aspects of the Multi-Host Pathogen *Clostridium perfringens* Reveals Significant Pangenome Diversity, and a Diverse Array of Virulence Factors. *Front Microbiol*, 8, 2485. doi: 10.3389/fmicb.2017.02485
- Kiu, R. et Hall, L. J. (2018). An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg Microbes Infect*, 7(1), 141. doi: 10.1038/s41426-018-0144-8
- Kulkarni, R. R., Parreira, V. R., Sharif, S. et Prescott, J. F. (2006). *Clostridium perfringens* antigens recognized by broiler chickens immune to necrotic enteritis. *Clin Vaccine Immunol*, 13(12), 1358-1362. doi: 10.1128/CI.00292-06

- Lacey, J., Johanesen, P. A., Keyburn, A. L., Ford, M., Portela, R. W., Moore, R. J. et Lyras, D. (2017). Conjugation-Mediated Horizontal Gene Transfer of *Clostridium perfringens* Plasmids in the Chicken Gastrointestinal Tract Results in the Formation of New Virulent Strains. *Appl Environ Microbiol*, *83*(24), 1814-1817.
- Lacey, J. A., Allnutt, T. R., Vezina, B., Van, T. T. H., Stent, T., Han, X., . . . Moore, R. J. (2018). Whole genome analysis reveals the diversity and evolutionary relationships between necrotic enteritis-causing strains of *Clostridium perfringens*. *BMC Genomics*, *19*(1), 379. doi: 10.1186/s12864-018-4771-1
- Lacey, J. A., Johanesen, P. A., Lyras, D. et Moore, R. J. (2016). Genomic diversity of necrotic enteritis-associated strains of *Clostridium perfringens*: a review. *Avian Pathol*, *45*(3), 302-307. doi: 10.1080/03079457.2016.1153799
- Lee, K. W., Lillehoj, H. S., Jeong, W., Jeung, H. Y. et An, D. J. (2011). Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci*, *90*(7), 1381-1390. doi: 10.3382/ps.2010-01319
- Lepp, D., Gong, J., Songer, J. G., Boerlin, P., Parreira, V. R. et Prescott, J. F. (2013). Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the netB plasmid. *J Bacteriol*, *195*(6), 1152-1166. doi: 10.1128/JB.01032-12
- Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V. R., Marri, P. R., Rosey, E. L., Gong, J., . . . Prescott, J. F. (2010). Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One*, *5*(5), e10795. doi: 10.1371/journal.pone.0010795
- Li, J., Paredes-Sabja, D., Sarker, M. R. et McClane, B. A. (2016). *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. *Microbiol Spectr*, *4*(3). doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015
- Lyras, D., Adams, V., Ballard, S. A., Teng, W. L., Howarth, P. M., Crellin, P. K., . . . Rood, J. I. (2009). tISCpe8, an IS1595-family lincomycin resistance element located on a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, *191*(20), 6345-6351. doi: 10.1128/JB.00668-09
- M'Sadeq, S. A., Wu, S., Swick, R. A. et Choct, M. (2015). Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Anim Nutr*, *1*(1), 1-11. doi: 10.1016/j.aninu.2015.02.004
- MacMillan, J. L., Vicaretti, S. D., Noyovitz, B., Xing, X., Low, K. E., Inglis, G. D., . . . Abbott, D. W. (2019). Structural analysis of broiler chicken small intestinal mucin O-glycan modification by *Clostridium perfringens*. *Poult Sci*, *98*(10), 5074-5088. doi: 10.3382/ps/pez297
- Manetti, A. G., Zingaretti, C., Falugi, F., Capo, S., Bombaci, M., Bagnoli, F., . . . Margarit, I. (2007). *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol*, *64*(4), 968-983. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05704.x
- MAPAQ (2019). *Portrait-Diagnostic Sectoriel De L'industrie De La Volaille Au Québec*. Québec.
- Matsunaga, N., Shimizu, H., Fujimoto, K., Watanabe, K., Yamasaki, T., Hatano, N., . . . Hitsumoto, Y. (2018). Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of *Clostridium perfringens* cells. *Anaerobe*, *51*, 124-130. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.05.001
- Meunier, M., Guyard-Nicodeme, M., Hirchaud, E., Parra, A., Chemaly, M. et Dory, D. (2016). Identification of Novel Vaccine Candidates against *Campylobacter* through Reverse Vaccinology. *J Immunol Res*, *2016*, 5715790. doi: 10.1155/2016/5715790

- Moore, R. J. (2016). Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathol*, 45(3), 275-281. doi: 10.1080/03079457.2016.1150587
- Mora, M., Veggi, D., Santini, L., Pizza, M. et Rappuoli, R. (2003). Reverse vaccinology. *Drug Discovery Today*, 8(10), 459-464. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02689-8
- Mot, D., Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. et Van Immerseel, F. (2014). Progress and problems in vaccination against necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Pathol*, 43(4), 290-300. doi: 10.1080/03079457.2014.939942
- Mueller, K., Blum, N. M., Kluge, H. et Mueller, A. S. (2012). Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic- and antioxidant enzymes in broiler chickens. *Br J Nutr*, 108(4), 588-602. doi: 10.1017/S0007114511005873
- Myers, G. S., Rasko, D. A., Cheung, J. K., Ravel, J., Seshadri, R., DeBoy, R. T., . . . Paulsen, I. T. (2006). Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res*, 16(8), 1031-1040. doi: 10.1101/gr.5238106
- Nariya, H., Miyata, S., Tamai, E., Sekiya, H., Maki, J. et Okabe, A. (2011). Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90(6), 1973-1979. doi: 10.1007/s00253-011-3253-z
- Paiva, D. et McElroy, A. (2014). Necrotic enteritis: Applications for the poultry industry. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(3), 557-566. doi: 10.3382/japr.2013-00925
- Parreira, V. R., Costa, M., Eikmeyer, F., Blom, J. et Prescott, J. F. (2012). Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids. *PLoS One*, 7(11), e49753. doi: 10.1371/journal.pone.0049753
- Perry, J. A., Westman, E. L. et Wright, G. D. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol*, 21, 45-50. doi: 10.1016/j.mib.2014.09.002
- Piepenbrink, K. H. et Sundberg, E. J. (2016). Motility and adhesion through type IV pili in Gram-positive bacteria. *Biochem Soc Trans*, 44(6), 1659-1666. doi: 10.1042/BST20160221
- Pizza, M., Scarlato, V., Massignani, V. et al., e. (2000). Identification of Vaccine Candidates against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. *Science: New Series*, 287(5459), pp. 1816-1820.
- PPC. (2018). Plan stratégique pour l'industrie canadienne du poulet 2019-2023.
- Prescott, J. F., Parreira, V. R., Mehdizadeh Gohari, I., Lepp, D. et Gong, J. (2016). The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. *Avian Pathol*, 45(3), 288-294. doi: 10.1080/03079457.2016.1139688
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. et Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*, 109(7), 309-318. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030
- Rappuoli, R. (2000). Reverse Vaccinology. *Current Opinion in Microbiology*, 3(5), 445-450.
- Read, A. F. et Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health*, 2014(1), 147. doi: 10.1093/emph/eou024
- Rinaudo, C. D., Telford, J. L., Rappuoli, R. et Seib, K. L. (2009). Vaccinology in the genome era. *J Clin Invest*, 119(9), 2515-2525. doi: 10.1172/JCI38330

- Rood, J. I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B. A., Melville, S. B., . . . Van Immerseel, F. (2018). Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, 53, 5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011
- Rood, J. I., Keyburn, A. L. et Moore, R. J. (2016). NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. *Avian Pathol*, 45(3), 295-301. doi: 10.1080/03079457.2016.1158781
- Rosini, R., Barocchi, M. A. et Rappuoli, R. (2011). *Microbial Vaccine Design: The Reverse Vaccinology Approach*. (1^e éd.). John Wiley & Sons, Inc.
- Sayeed, S., Li, J. et McClane, B. A. (2007). Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infect Immun*, 75(5), 2391-2398. doi: 10.1128/IAI.02014-06
- Sayeed, S., Li, J. et McClane, B. A. (2010). Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. *Infect Immun*, 78(1), 495-504. doi: 10.1128/IAI.00838-09
- SC. (2014). Cadre d'action fédérale Santé Canada.
- Scott, J. R. et Barnett, T. C. (2006). Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annu Rev Microbiol*, 60, 397-423. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142256
- Sengupta, N., Alam, S. I., Kumar, B., Kumar, R. B., Gautam, V., Kumar, S. et Singh, L. (2010). Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of *Clostridium perfringens* type A and type C strains. *Infect Immun*, 78(9), 3957-3968. doi: 10.1128/IAI.00374-10
- Stanley, D., Keyburn, A. L., Denman, S. E. et Moore, R. J. (2012). Changes in the caecal microflora of chickens following *Clostridium perfringens* challenge to induce necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 159(1-2), 155-162. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.032
- Thompson, D. R., Parreira, V. R., Kulkarni, R. R. et Prescott, J. F. (2006). Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Vet Microbiol*, 113(1-2), 25-34. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.015
- Timbermont, L., De Smet, L., Van Nieuwerburgh, P., Parreira, V. R., Van Driessche, G., Haesebrouck, F., . . . Van Immerseel, F. (2014). Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Veterinary Research*, 45:40.
- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. et Van Immerseel, F. (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol*, 40(4), 341-347. doi: 10.1080/03079457.2011.590967
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Dewulf, J., Nollet, N., Schwarzer, K., Haesebrouck, F., . . . Van Immerseel, F. (2010). Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol*, 39(2), 117-121. doi: 10.1080/03079451003610586
- Torres-Barcelo, C. (2018). The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg Microbes Infect*, 7(1), 168. doi: 10.1038/s41426-018-0169-z
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F. et Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol*, 33(6), 537-549. doi: 10.1080/03079450400013162
- Van Immerseel, F., Rood, J. I., Moore, R. J. et Titball, R. W. (2009). Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol*, 17(1), 32-36. doi: 10.1016/j.tim.2008.09.005

- Varga, J. J., Nguyen, V., O'Brien, D. K., Rodgers, K., Walker, R. A. et Melville, S. B. (2006). Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Mol Microbiol*, 62(3), 680-694. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05414.x
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *P&T*, 40(4).
- Vermeulen, A. N., Schaap, D. C. et Schetters, T. P. M. (2001). Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*, 100 13-20.
- Wade, B., Keyburn, A. L., Haring, V., Ford, M., Rood, J. I. et Moore, R. J. (2016). The adherent abilities of *Clostridium perfringens* strains are critical for the pathogenesis of avian necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 197, 53-61. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.10.028
- Wade, B., Keyburn, A. L., Seemann, T., Rood, J. I. et Moore, R. J. (2015). Binding of *Clostridium perfringens* to collagen correlates with the ability to cause necrotic enteritis in chickens. *Vet Microbiol*, 180(3-4), 299-303. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.09.019
- WHO. (2014). ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on surveillance
- Widjaja, M., Harvey, K. L., Hagemann, L., Berry, I. J., Jarocki, V. M., Raymond, B. B. A., . . . Djordjevic, S. P. (2017). Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. *Sci Rep*, 7(1), 11227. doi: 10.1038/s41598-017-10644-z
- Wu, S. B., Stanley, D., Rodgers, N., Swick, R. A. et Moore, R. J. (2014). Two necrotic enteritis predisposing factors, dietary fishmeal and *Eimeria* infection, induce large changes in the caecal microbiota of broiler chickens. *Vet Microbiol*, 169(3-4), 188-197. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.007
- Zahoor, I., Ghayas, A. et Basheer, A. (2018). Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: a review. *Mol Biol Rep*, 45(1), 31-37. doi: 10.1007/s11033-017-4138-8
- Zhou, H., Lepp, D., Pei, Y., Liu, M., Yin, X., Ma, R., . . . Gong, J. (2017). Influence of pCP1NetB ancillary genes on the virulence of *Clostridium perfringens* poultry necrotic enteritis strain CP1. *Gut Pathog*, 9, 6. doi: 10.1186/s13099-016-0152-y