



***Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*
UL719 et la nisine : une nouvelle approche dans le
traitement des infections à *Clostridium difficile***

Thèse

Christophe Le Lay

Doctorat en sciences et technologie des aliments
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Christophe Le Lay, 2015

***Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*
UL719 et la nisine : une nouvelle approche dans le
traitement des infections à *Clostridium difficile***

Thèse

Christophe Le Lay

Sous la direction de :

Ismaïl Fliss, directeur de recherche
Marc Ouellette, codirecteur de recherche

Résumé

Clostridium difficile est le microorganisme le plus fréquemment identifié dans les pathologies entériques pour des patients souffrants de coliques pseudomembraneuses et de diarrhées associées aux antibiotiques. Les drogues les plus communément utilisées pour traiter les maladies associées à *C. difficile* sont limitées au métronidazole et à la vancomycine puisque de nombreuses souches isolées cliniquement de *C. difficile* sont résistantes à de nombreux antibiotiques couramment utilisés pour traiter des infections à bactéries Gram positif. La recherche de nouveaux traitements pour limiter l'incidence de *C. difficile* demeure une urgence pour le secteur de la santé. L'usage de probiotiques, particulièrement de bactéries lactiques métaboliquement actives, a récemment été proposé à la communauté médicale comme une alternative.

Dans ce contexte, le but de cette étude est d'évaluer la capacité de la bactérie lactique *Lactococcus lactis* UL719 et la nisine à inhiber *C. difficile* dans les conditions intestinales.

Dans un premier temps, l'activité antibactérienne de la nisine contre des souches cliniques de *C. difficile* a montré que la nisine était active à des concentrations minimales d'inhibition comprises entre 0,8 et 51,2 µg/mL dépendamment des souches. De plus, la nisine est capable d'inhiber la germination des spores de *C. difficile*. Suite à ces résultats, la survie de la souche productrice de nisine, *L. lactis* UL719 et la stabilité physicochimique de la nisine ont été évaluées à l'aide d'un simulateur du tractus gastro-intestinal. Les résultats ont démontré la capacité de la souche productrice de nisine à survivre au tractus gastro-intestinal avec un taux de survie de 0,5 % et, malgré les conditions de stress gastro-intestinal, à garder la capacité à produire sa bactériocine. Par contre, la nisine seule perdait son activité antimicrobienne suite à son passage dans le duodénum. Finalement, quand l'activité antimicrobienne a été évaluée dans un modèle *in vitro* de fermentation colique simulant les conditions physiologiques intestinales, *L. lactis* UL719 n'a pas d'effet sur *C. difficile* mais la nisine a montré une inhibition totale de ce pathogène. Il a aussi été observé que la nisine avait un léger effet inhibant sur la population bactérienne à Gram-positif dans le modèle colique *in vitro* humain mais l'effet est temporaire.

Abstract

Clostridium difficile is the most frequently identified enteric pathogen in patients with nosocomial antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. The most common drugs used to treat diseases associated with *C. difficile* are limited to metronidazole and vancomycin since most clinically isolated *C. difficile* strains are resistant to many antibiotics currently used to treat Gram-positive bacterial infections. The search for new treatments to limit the impact of *C. difficile* becomes an urgent need for the health sector. The use of probiotics, particularly metabolically active lactic acid bacteria, was recently proposed as an alternative for the medical community.

In this context, the aim of the study was to investigate the capacity of the lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* UL719 and nisin to inhibit *C. difficile* in intestinal conditions.

First, the antibacterial activity of nisin against clinical strains of *C. difficile* showed that it was active with minimum inhibitory concentrations between 0.8 and 51.2 µg/mL, depending on the strains. In addition, nisin was able to inhibit spore germination of *C. difficile*. Given these results, the survival of the nisin-producing strain, *L. lactis* UL719 and the physicochemical stability of nisin were evaluated using a simulator of the gastrointestinal tract. The results demonstrated the ability of the nisin producing strain to survive the gastrointestinal tract with a 0.5 % survival rate and, despite the conditions of gastrointestinal stress, to keep its ability to produce the bacteriocin. However, the nisin alone lost its antimicrobial activity after its passage through the duodenum. Finally, when the antimicrobial activity was evaluated in an *in vitro* model of colic fermentation simulating physiological intestinal conditions, *L. lactis* UL719 had no effect on *C. difficile*, but nisin showed a complete inhibition of this pathogen. It was also observed that nisin had a slight inhibitory effect on the Gram-positive bacterial population in the *in vitro* human colic model, but the effect was temporary.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xvii
Avant-propos	xix
Introduction	1
Chapitre 1 Revue de littérature.....	3
1.1 Le microbiote gastro-intestinal	3
1.1.1 La répartition des microorganismes dans le tractus gastro-intestinal	3
1.1.2 L'établissement et l'évolution du microbiote colique au cours du temps.....	4
1.1.3 Les facteurs qui influencent le développement du microbiote colique.....	5
1.1.3.1 Le mode d'accouchement et le terme à la naissance	5
1.1.3.2 Les habitudes alimentaires et d'hygiène.....	6
1.1.3.3 Le mode d'alimentation.....	6
1.1.3.4 L'usage d'antibiotiques	7
1.1.4 Les interactions du microbiote avec l'hôte	7
1.1.4.1 Le développement et la maturation du système immunitaire grâce au microbiote intestinal	7
1.1.4.2 La protection de l'hôte par le microbiote intestinal.....	8
1.1.4.3 Le développement de la structure et des fonctions normales du tractus gastro-intestinal grâce au microbiote.....	9
1.1.4.4 La nutrition et le métabolisme.....	10
1.1.4.4.1 Le métabolisme des glucides	10
1.1.4.4.2 Le métabolisme des protéines.....	11
1.1.4.4.3 Le métabolisme des lipides.....	12
1.1.5 Techniques d'étude de la diversité bactérienne du microbiote intestinal.....	12
1.1.5.1 La PCR en temps réel (qPCR).....	14

1.1.5.2 Les techniques d’empreintes moléculaires	14
1.1.5.3 Les techniques d’hybridation.....	15
1.1.5.4 Les méthodes de séquençage.....	15
1.1.6 Modèles <i>in vitro</i> de fermentation pour étudier le microbiote colique.....	17
1.1.6.1 Les systèmes de fermentation en «batch»	17
1.1.6.2 Les systèmes de fermentation en continu	18
1.1.7 La perturbation du microbiote adulte	21
1.1.7.1 Le stress	21
1.1.7.2 La diète	21
1.1.7.3 Les antibiotiques.....	22
1.2 <i>Clostridium difficile</i>	23
1.2.1 Historique.....	23
1.2.2 Les mécanismes de toxicité (pathogénicité et virulence).....	24
1.2.2.1 Les toxines A et B	24
1.2.2.2 La toxine binaire.....	27
1.2.3 Les facteurs de risques	29
1.2.4 La gestion et le traitement des infections à <i>C. difficile</i>	30
1.2.5 La récurrence et la résistance	31
1.2.6 Les traitements alternatifs des infections à <i>C. difficile</i>	32
1.3 Les probiotiques.....	33
1.3.1 Le mode de sélection.....	34
1.3.1.1 L’identification de la souche	35
1.3.1.2 L’évaluation du potentiel probiotique par des essais <i>in vitro</i>	36
1.3.1.3 L’évaluation de l’innocuité de la souche.....	36
1.3.1.4 L’évaluation de l’efficacité du probiotique par essai clinique sur animaux ou humains.....	36
1.3.1.5 La réglementation en terme d’allégations santé et d’étiquetage.....	37
1.3.2 Les mécanismes d’action des probiotiques	37
1.3.2.1 La modulation des défenses de l’hôte.....	38
1.3.2.1.1 L’effet sur la fonction barrière de l’épithélium.....	38
1.3.2.1.2 L’effet sur l’inflammation.....	39

1.3.2.1.3 L'effet sur le système immunitaire	39
1.3.2.1.4 L'effet sur la production de peptides antimicrobiens	40
1.3.2.2 L'action directe sur les microorganismes commensaux ou pathogènes.....	40
1.3.2.2.1 La compétition pour les nutriments	40
1.3.2.2.2 L'exclusion compétitive.....	40
1.3.2.2.3 L'effet antitoxine	41
1.3.2.2.4 La production de composés antimicrobiens.....	41
1.3.2.2.4.1 Les acides organiques	41
1.3.2.2.4.2 Le peroxyde d'hydrogène	41
1.3.2.2.4.3 Les bactériocines	41
1.4 Les bactériocines.....	42
1.4.1 La classification des bactériocines produites par des bactéries à Gram positif ...	43
1.4.1.1 La classe I : les bactériocines avec modification post-traductionnelle.....	43
1.4.1.1.1 La classe Ia (les lantibiotiques).....	44
1.4.1.1.2 La classe Ib (les labyrinthopeptides).....	44
1.4.1.1.3 La classe Ic (les sactibiotiques).....	44
1.4.1.2 La classe II : les bactériocines sans modification post-traductionnelle.....	44
1.4.1.2.1 La classe IIa (les bactériocines ressemblant à la pédiocine).....	45
1.4.1.2.2 La classe IIb (les bactériocines à deux peptides)	45
1.4.1.2.3 La classe IIc (les bactériocines circulaires)	45
1.4.1.2.4 La classe IId (les bactériocines linéaires ne ressemblant pas à la pédiocine)	45
1.4.1.3 Les bactériolysines	45
1.4.2 Le mode d'action des bactériocines	46
1.4.2.1 Le mode d'action de la classe I	46
1.4.2.2 Le mode d'action de la classe II	46
1.4.2.3 Le mode d'action des bactériolysines.....	46
1.4.3 La nisine	47
1.4.4 Les bactériocines pour lutter contre les infections nosocomiales et gastro-intestinales.....	50
Chapitre 2 Problématique, hypothèse et objectifs	52

2.1 Problématique	52
2.2 Hypothèse	52
2.3 Objectifs	52
Chapitre 3 La nisine est un inhibiteur efficace des cellules végétatives et de la germination des spores de <i>Clostridium difficile</i>	53
3.1 Résumé	54
3.2 Abstract	55
3.3 Introduction	56
3.4 Materials and methods	57
3.4.1 Bacterial strains and growth media	57
3.4.2 Antibiotics and antimicrobial substances	57
3.4.3 Measurement of bacteriocin activity	58
3.4.4 Susceptibility of <i>C. difficile</i> isolates to antibiotics and to nisins A and Z	58
3.4.5 Transmission electron microscopy	59
3.4.6 Spore preparation	59
3.4.7 Spore viability in the presence of nisin	60
3.4.8 Effect of nisin on <i>C. difficile</i> spore germination	60
3.4.9 Statistical analyses	60
3.5 Results	61
3.5.1 Susceptibility of clinical isolates of <i>C. difficile</i> to antibiotics and nisin	61
3.5.2 Transmission electron microscopy	65
3.5.3 Effect of nisin A on <i>C. difficile</i> spores	65
3.5.4 Effect of nisin A on <i>C. difficile</i> spore germination	65
3.6 Discussion	68
3.7 Acknowledgments	70
Chapitre 4 Survie de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> UL719 aux conditions du tractus gastro-intestinal proximal dans un modèle <i>in vitro</i> dynamique	71
4.1 Résumé	72
4.2 Abstract	73
4.3 Introduction	74
4.4 Materials and methods	76

4.4.1 Bacterial strains and growth media	76
4.4.2 Nisin Z production and purification	76
4.4.3 TIM-1 dynamic model	76
4.4.4 Digestion and sampling.....	78
4.4.5 Assessment of bacteriocin activity.....	79
4.4.5.1 Agar well diffusion test	79
4.4.5.2 Critical-dilution micromethod	79
4.4.6 Double-agar layer technique	80
4.4.7 Statistical analyses	80
4.5 Results.....	81
4.5.1 Survival of <i>L. lactis subsp. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> UL719 in the dynamic GI TIM-1 model	81
4.5.2 Capacity of the strain to produced nisin after passage through GIT	83
4.5.3 Stability of nisin Z in dynamic gastro-intestinal conditions	83
4.6 Discussion.....	87
4.7 Acknowledgements.....	90
Chapitre 5 Compétitivité de <i>Lactococcus lactis</i> UL719 et la capacité de la nisine (Nisaplin®) à inhiber <i>Clostridium difficile</i> dans un modèle de colon humain.	91
5.1 Résumé.....	92
5.2 Abstract.....	93
5.3 Introduction.....	94
5.4 Materials and methods	95
5.4.1 Bacterial strains and growth conditions	95
5.4.2 Development of large intestine fermentation model	96
5.4.2.1 Feces collection and immobilization in gel beads.....	96
5.4.2.2 Nutritive medium.....	96
5.4.2.3 Experimental setup and sampling.....	96
5.4.3 Microbiota composition analysis using q-PCR coupled to PMA treatment	97
5.4.4 Analyses of metabolites	98
5.4.5 Statistical analysis	98
5.5 Results.....	101

5.5.1 Microbiota composition during stabilization period	101
5.5.2 <i>Lactococcus lactis</i> UL719 alone or in presence of <i>C. difficile</i> ATCC43255 have no perturbing impact on intestinal microbiota under simulated colonic conditions	101
5.5.3 A nisin concentration of 20× the MIC is required to effective inhibition of <i>C. difficile</i> ATCC43255 in a model of human colon	102
5.6 Discussion	109
5.7 Acknowledgments	111
Conclusion générale et perspectives	112
Références	119

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Techniques utilisées pour l'étude du microbiote intestinal.	13
Tableau 1.2 : Avantages et limites des modèles <i>in vitro</i> de fermentation [118].	20
Tableau 1.3 : Guide pour le traitement des infections à <i>C. difficile</i>	31
Table 3.1 Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ^a of bacteriocins and antibiotics against strains of <i>Clostridium difficile</i>	63
Table 5.1 Primers used for the detection of different bacterial groups in inoculum or fermentation samples by real-time qPCR analysis.	100
Table 5.2 Bacterial cell counts in the fecal inoculum and during the fermentation at the end of the stabilization period of the continuous culture measured by qPCR.	103
Table 5.3 Impact of <i>Lactococcus lactis</i> UL719 (10^9 CFU/mL) and/or <i>C. difficile</i> ATCC43255 (5×10^6 CFU/mL) addition on the microbiota.	104
Table 5.4 Concentration of short chain fatty acids (SFCA) in effluent samples at 4 h following various treatments.	105

Liste des figures

- Figure 1.1** Composition de la flore bactérienne dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal (adapté de [18, 21, 24]). 4
- Figure 1.2** Représentations schématiques de (1) la région PaLoc (19,6 kb) contenant les gènes codant la toxine A et la toxine B et (2) l'organisation des domaines des toxines A et B de *C. difficile*. Les toxines A et B sont constituées de 4 domaines : le domaine N-terminal où se situe l'activité biologique (glycosyltransférase) (A), le domaine C-terminal permettant l'adhésion de la toxine (B), le domaine permettant le clivage auto-catalytique (cystéine protéase) (C) et le domaine hydrophobique permettant la translocation de la toxine (D) (adapté de [156, 160]). 25
- Figure 1.3** Mode d'action des toxines A et B (adapté de Shen [162]). 26
- Figure 1.4** Représentations schématiques de (1) la région CdtLoc (6,2 kb) contenant les gènes codant la toxine binaire et (2) l'organisation des domaines des toxines CDTa et CDTb de *C. difficile* (adapté de [165, 167]). 27
- Figure 1.5** Mode d'action de la toxine binaire (adapté de [162]). 28
- Figure 1.6** Critères d'évaluation d'un probiotique (adapté de FAO/WHO [216]). 35
- Figure 1.7** Principaux mécanismes d'action des microorganismes probiotiques au niveau du tractus gastro-intestinal (adapté de O'Toole and Cooney [15]). 38
- Figure 1.8** Structure de la nisine A. Les résidus déhydroalanine (Dha) et déhydrobutyrine (Dhb) sont obtenus par la déshydratation engendrée par NisB sur les sérines (Ser) et les thréonines (Thr) sélectionnées, respectivement. Cette déshydratation se fait par le biais d'une phosphorylation des sérines et des thréonines suivie d'une élimination du groupement phosphate, ce qui génère les résidus Dha et Dhb. Il s'en suit une cyclisation (5) entre une cystéine et un résidu Dha ou Dhb formant soit une lanthionine ou une méthyl-lanthionine, respectivement. La nisine mature est obtenue après le clivage protéolytique du prépeptide grâce à NisP (adapté d'Arnison *et al.*, [252]). 48
- Figure 1.9** Représentation schématique de la biosynthèse et de la régulation de la nisine dans *Lactococcus lactis*. Le peptide précurseur de la nisine est synthétisé (encodé par NisA), modifié (déshydratation avec NisB, cyclisation avec NisC), puis transloqué (NisT) et finalement après une protéolyse (NisP), la nisine mature est libérée. La nisine agit comme peptide antimicrobien et aussi comme peptide phéromonal qui peut induire une activation de sa propre biosynthèse via les deux composés de régulation NisK et NisR. La cellule

productrice possède une protection contre l'action de la nisine grâce au système d'immunité composé de NisI et NisEFG (adapté de Cheigh and Pyun [278]). 49

Figure 3.1 Inhibitory activity of bacteriocins nisin A and nisin Z against *P. acidilactici* UL5 (sensitive strain) and *C. difficile* ATCC 630, as revealed by zones of clearing in the agar diffusion assay. 62

Figure 3.2 Transmission electron micrographs of *C. difficile* ATCC 630 grown in BHI broth and treated in suspension (10^6 CFU) for 1 min with (a) no inhibitor; (b) nisin A ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (c) nisin Z ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (d) vancomycin ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (e) nisin A ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and (f) nisin Z ($128 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Bar = $1 \mu\text{m}$ 64

Figure 3.3 Viability of *C. difficile* spores treated with nisin A at different concentrations for 1 h (white) and 24 h (black). Spores were washed, plated on BHI agar containing sodium taurocholate and incubated anaerobically for 24 h at 37°C . Germinated spores were counted. Values are mean \pm SD for four separate experiments. Symbols indicate significant difference between viability in the presence and absence of nisin ($P \leq 0.05$). 66

Figure 3.4 Inhibition of *C. difficile* spore germination by nisin A. Spores were plated on BHI agar containing sodium taurocholate and bacteriocin and incubated anaerobically for 24 h at 37°C . Values are mean \pm SD for four separate experiments. Asterisks indicate significant difference between viability in the presence and absence of nisin ($P \leq 0.05$). 67

Figure 4.1 the multi-compartmental dynamic TIM-1 model of gastrointestinal system. Vessels A, B, C and D constitute the gastric, duodenal, jejunal and ileal compartments, respectively. Modules (E) are semi-permeable hollow fibre membrane dialysis units. (F) Peristaltic valves, (G) ileo-caecal valves, (H) pH electrodes, (I) temperature sensor, (J) stomach secretion inlets, (K) duodenal secretion inlets, (L) and (M) bicarbonate secretion inlet and (N) volume detecting sensors. 77

Figure 4.2 Proportion (%) of fermented milk sample distributed in the compartments of TIM-1 model or cumulated in ileal-delivered effluent (a) and survival of *Lactococcus lactis* UL719 (CFU.mL^{-1} of fermented skim milk) in the compartments of the TIM-1 model during 5h digestion (b)(stomach (diamond); duodenum (square); jejunum (triangle); ileum (cross); efflux(circle)). Percentages were calculated by Shortcut to Timall 041201 software (TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands) for the slow transit protocol. Data are means of two independent repetitions. 82

Figure 4.3 Double-agar assay showing inhibition of *Pediococcus acidilactici* UL5 by *Lactococcus lactis* UL719 recovered from different compartments during digestion of an overnight skim milk culture of *Lactococcus lactis* UL719. Lactococcal colonies were

selected randomly from MRS agar medium from gastric compartment after 105 min of digestion (a), from duodenal compartment after 180 min of digestion (b) and from the exit of ileal compartment after 300 min of digestion (c). 84

Figure 4.4 Agar diffusion test showing the biological activity of nisin Z against *Pediococcus acidilactici* UL5 for samples taken during digestion of skim milk sample fermented for an overnight with *Lactococcus lactis* UL719. S35-105 are from gastric compartment at 0, 35, 70 and 105 min of digestion. D30-120 are from the duodenal compartment at 30, 60, 90 and 120 min of digestion. J60-300 and I60-300 are from jejunal and ileal compartments at 60, 120, 180, 240 and 300 min of digestion. T0, 24 h skim milk culture of *Lactococcus lactis* UL719 not subjected to the TIM-1 treatment. 85

Figure 4.5 Agar diffusion test showing the biological activity of nisin Z against *Pediococcus acidilactici* UL5 for samples taken during digestion of purified nisin Z (10 mg per 300 mL of skim milk acidified at pH 5.3). S35-105 are from gastric compartment at 0, 35, 70 and 105 min of digestion. D30-120 are from the duodenal compartment at 30, 60, 90 and 120 min of digestion. J60-300 and I60-300 are from jejunal and ileal compartments at 60, 120, 180, 240 and 300 min of digestion. NZ, purified nisin Z in skim milk not subjected to the TIM-1 treatment. 86

Figure 5.1 Time schedule of continuous intestinal fermentation during the different treatment periods. BC, bead colonization. *Lactococcus lactis* UL719 was added at final concentration of (10^9 CFU/mL) in the reactor. *C. difficile* ATCC43255 was added at a final concentration of 5×10^6 CFU/mL. 99

Figure 5.2 Survival of *Lactococcus lactis* UL719 after its last addition (day 62) in a human colon model. *L. lactis* UL719 (circle); theoretical washout (square). 106

Figure 5.3 Inhibitory activity of nisin at $5 \times$ and $20 \times$ the MIC ($3.8 \mu\text{mol/L}$) and *Lactococcus lactis* UL719 (10^9 UFC/mL) against *Clostridium difficile* ATCC43255 in a human colon model. *C. difficile* alone (black diamond); *C. difficile* plus nisin $5 \times$ (white triangle); *C. difficile* plus nisin $20 \times$ (cross); *C. difficile* plus *L. lactis* UL719 (white circle); theoretical washout (white square). 107

Figure 5.4 Impact of nisin addition at $76 \mu\text{mol/L}$ ($20 \times$ the MIC vs *Clostridium difficile* ATCC43255) on microbiota population enumerated by qPCR. Total bacteria (white diamond); *Lachnospiraceae* group. (white square); *Ruminococcaceae* group. (white triangle); *Bacteroidetes* (cross); Bifidobacteria (black triangle); *Enterobacteriaceae* (white circle); *Lactobacillaceae/Leuconostocaceae* group. (black square); Values with asterisk are significantly different ($P < 0.05$). 108

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AGCC	acide gras à courtes chaînes
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	adenosine triphosphate
AU	<i>arbitrary units</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BL	bactérie lactique
CDAD	<i>C. difficile associated diarrhea</i>
CDT	toxine binaire de <i>C. difficile</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
CMI	concentration minimale d'inhibition
CPM	colite pseudomembraneuse
DAA	diarrhée associée aux antibiotiques
DACD	diarrhée associée à <i>C. difficile</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GI	gastro-intestinal
GIT	<i>gastrointestinal tract</i>
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICD	infection à <i>Clostridium difficile</i>
IDSA	<i>infectious diseases society of America</i>
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
LAB	<i>lactic acid bacteria</i>
LCT	<i>large clostridial toxin</i>
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>

MRS de Man, Ragosa, Sharpe
OD *optical density*
PAM peptide antimicrobien
PCR *polymerase chain reaction*
PMA propidium monoazide
qPCR PCR quantitative en temps réel
SCFA *short chain fatty acid*
SD *standard deviation*
SHEA *society of healthcare and epidemiology of America*
Tcd toxine de *C. difficile*
TGI tractus gastro-intestinal
TMF transplantation de microbiote fécal
TNF *tumoral necrosis factor*
UFC unite formant colonies
VIH virus de l'immunodéficience humaine
WHO *world health organization*

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Ismaïl Fliss pour m'avoir donné la chance de pouvoir effectuer ce doctorat au sein de son équipe de recherche et de m'avoir accordé sa confiance pour mener ce projet de recherche. J'aimerais également remercier mon codirecteur de recherche, le Dr. Marc Ouellette pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et mis à ma disposition les ressources nécessaires pour mener à bien ce projet.

Je tiens aussi à remercier les membres du comité examinateur de cette thèse, Dr. Lucie Beaulieu (pré-lectrice), Dr. Gisèle Lapointe et Dr. Christophe Chassard pour le temps que vous avez accordé pour évaluer l'ensemble du document.

Je tiens à remercier Larbi Dridi pour son aide lors de mes manipulations au sein du laboratoire du Dr Ouellette, le Dr. Ehab Kheadr pour son aide avec le modèle *in vitro* de digestion. Je remercie particulièrement Riadh Hammami pour son soutien pour la rédaction de mes articles et pour les discussions concernant ces derniers. Enfin, un grand merci à Benoit Fernandez avec qui j'ai passé énormément de temps à faire la mise au point du modèle de fermentation colique et de la quantification biomoléculaire.

J'aimerais aussi remercier le personnel du laboratoire qui nous apporte beaucoup d'aide : Diane Gagnon, Marie-Michelle Gagnon, Hélène Gingras, Suzanne Avoine, Céline Paquin, Catherine Viel, Alain Gaudreau, Mélanie Martineau.

Je remercie aussi les organismes subventionnaires sans qui les projets ne pourraient être financés. Merci au Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies (FRQNT) et au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

Je tiens aussi à remercier mes collègues présents ainsi que mes amis pour leur soutien et leur aide constante : Allison, Marie-Hélène, Hajer, Alain, Cyril, Jérémie, Amine, Éric, Stéphane, Arnaud, Guillaume, Mélanie, Alice, Anne-Catherine, Gilles et tous ceux que j'oublie.

J'aimerais finalement remercier du fond de mon cœur ma famille, que j'aime, et qui m'a soutenue tout au long de cette aventure. Un gros merci à toi maman, Brigitte et mon frère,

Julien ainsi qu'à mes merveilleux grands-parents, Gabriel et Jeanine et aussi au reste de la famille Aimée, Gilbert, Didier et Philippe. Je tiens à dédier cette thèse à mon père, Jean-François, toi qui n'as pas pu voir mon accomplissement, tu nous manques beaucoup.

Avant-propos

Cette thèse de doctorat est divisée en 7 parties dont 5 chapitres. L'introduction générale du projet de recherche servira de première partie. Le premier chapitre sera une revue de littérature sur le sujet permettant d'exposer les connaissances actuelles sur le microbiote colique, les infections à *Clostridium difficile*, les probiotiques ainsi que sur les bactériocines. Le chapitre 2 permettra d'amener la problématique, ainsi que l'hypothèse et les objectifs du projet de recherche.

Les trois chapitres suivant sont rédigés en anglais sous la forme d'articles scientifiques.

Le chapitre 3 intitulé «**Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination**» a été réalisé sous la direction du Dr. Ismaïl Fliss et du Dr. Marc Ouellette. Larbi Dridi, stagiaire post-doctoral, m'a aidé lors de la conception et des manipulations. Le Dr. Bergeron a contribué à l'isolation de souches cliniques de *Clostridium difficile*. La plus grande partie des expériences, le traitement des résultats ainsi que la rédaction de cet article ont été réalisés par moi-même. Cet article a été publié dans «*Journal of medical microbiology*».

Le chapitre 4 intitulé «**Survival of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* UL719, in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic *in vitro* model**» a été réalisé sous la direction du Dr. Ismaïl Fliss. J'ai effectué les analyses, le traitement des résultats et la rédaction de cet article. Cet article sera soumis dans «*Journal of applied microbiology*»

Le chapitre 5 intitulé «**On *Lactococcus lactis* UL719 competitiveness and nisin (Nisaplin®) capacity to inhibit *Clostridium difficile* in a model of human colon**» a été réalisé sous la direction du Dr. Ismaïl Fliss et du Dr. Marc Ouellette. Dr. Benoit Fernandez m'a aidé pour les manipulations et le Dr. Riadh Hammami a contribué à la rédaction de l'article. Le traitement et l'analyse des résultats ainsi que la plus grande partie de la rédaction ont été réalisés par moi-même. Cet article a été publié dans «*Frontiers in microbiology*».

La dernière partie sera une conclusion générale sur le projet de recherche ainsi que la proposition de perspectives générales.

Introduction

L'infection à *Clostridium difficile* (ICD) est un problème de santé publique à l'incidence et à la gravité croissantes aux États-Unis, au Canada et dans de nombreux pays européens [1-3]. Entre 2004 et 2005, une épidémie d'ICD s'est déclarée au Québec et a engendré plus d'un millier de décès (Institut national de santé publique du Québec, 2011). Au cours de cette période, le taux moyen d'incidence d'ICD nosocomiale était de 10,5 cas pour 1000 admissions avec un taux de mortalité de 16,2 % par cas recensé. Un taux d'incidence de 15,2 cas pour 1000 admissions a été atteint au plus fort de l'épidémie. Aujourd'hui au Québec, le taux moyen d'incidence d'ICD nosocomiale est de 5,6 cas pour 1000 admissions avec un taux de mortalité de 15,1 % (<http://www.inspq.qc.ca/infectionsnosocomiales/spin-cd/surveillance-2013-2014>). Outre l'impact sur la santé publique, les coûts liés à cette problématique sont très importants. Aux États-Unis, ces infections constituent un fardeau considérable sur le système de santé évalué à plus de 3 milliards de dollars par année [4].

Pendant plus de 30 ans, les ICDs ont pu être correctement traitées par du métronidazole ou de la vancomycine avec une fréquence rare de récurrences ou de formes sévères et/ou compliquées. Depuis les dernières épidémies au début des années 2000, les échecs cliniques avec la métronidazole et la vancomycine sont devenus plus fréquents et le nombre de récurrences a augmenté. Des souches avec une sensibilité réduite au métronidazole ont été isolées [5]. Ce constat préoccupant a entraîné la recherche de nouvelles alternatives pour le traitement des ICDs. Plusieurs alternatives ont été avancées ces dernières années, incluant la recherche de nouvelles molécules antibiotiques comme la fidaxomicin [6], de nouvelles approches biothérapeutiques comme la transplantation du microbiote fécal [7] ou encore l'usage de probiotiques [8].

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes qui lorsque administrés à des doses adéquates, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte [9]. Plusieurs effets bénéfiques ont été associés aux probiotiques, dont la stimulation du système immunitaire [10], la prévention des diarrhées dues aux virus et aux prises d'antibiotiques [11, 12], la réduction des allergies chez l'enfant [13] et la protection et la lutte contre les infections et pathologies intestinale [14]. Les mécanismes d'action des probiotiques sont nombreux et incluent la production de composés antimicrobiens comme les bactériocines [15].

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens issus de la synthèse ribosomale chez les bactéries. De nombreuses études ont montré que certaines bactériocines avaient une action inhibitrice *in vitro* sur de nombreuses souches pathogènes. Parmi elles, on retrouve la nisine qui est la seule bactériocine admise dans plus de 50 pays comme additif alimentaire en Europe et approuvé par la FDA (statut GRAS, generally recognized as safe) [16]. La nisine est active contre les bactéries à Gram positifs et principalement les bactéries lactiques, *Bacillus* et *Clostridium* [17]. Grâce à son spectre d'activité et son statut GRAS, la nisine semble être une alternative naturelle et intéressante à l'usage d'antibiotiques dans le cadre d'ICD.

L'objectif scientifique de ce projet de doctorat est d'évaluer la capacité du candidat probiotique *L. lactis* UL719 producteur de nisine à survivre au niveau du tractus gastro-intestinal et à inhiber *Clostridium difficile* via sa production de bactériocine.

Chapitre 1 Revue de littérature

1.1 Le microbiote gastro-intestinal

1.1.1 La répartition des microorganismes dans le tractus gastro-intestinal

Du point de vue microbiologique, l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes : l'estomac, le petit intestin et le côlon. Les phylums bactériens retrouvés dans ces différentes régions sont présentés dans la Figure 1.1.

Dans l'estomac, la forte acidité, pH variant entre 1 et 5 dépendamment de la prise alimentaire, est responsable de la faible prolifération microbienne (10^1 - 10^4 unités formatrices de colonies par gramme; UFC/g). Les phylums bactériens retrouvés dans cette partie du tractus gastro-intestinal (TGI) sont les *Firmicutes*, les *Actinobacteria*, les *Bacteroidetes*, les *Proteobacteria* et les *Fusabacteria* [18, 19].

Le petit intestin est divisé en trois sous-sections : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Étant donné le transit rapide, les sécrétions biliaires et pancréatiques ainsi que la sécrétion de molécules antimicrobiennes produites par l'hôte (comme les immunoglobulines A (IgA), les défensines, les cathélicidines et les lectines de type C), la croissance bactérienne est limitée [19, 20]. La microflore est constituée essentiellement de *Firmicutes*, d'*Actinobacteria* et de *Bacteroidetes*, à raison d'entre 10^3 et 10^8 UFC/g, selon la section du petit intestin [18].

Finalement, le côlon (un environnement dépourvu d'oxygène et ayant un pH compris entre 5 et 7) comporte une flore microbienne plus abondante (10^{10-12} UFC/g) et très complexe, qui est dominée par les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*. Ces groupes constituent 60-80 % et 15-30 % des bactéries totales, respectivement [19, 21-24]. Le phylum *Actinobacteria* y est présent dans une proportion de 2-10 % et peut atteindre jusqu'à 25 %. Pour leur part, les *Proteobacteria* et les *Verrumicrobia* représentent seulement 1-2 % et moins des bactéries totales [24, 25]. Le microbiote intestinal se trouve dans le côlon sous deux états : l'état sessile, où les bactéries sont fixées à des particules alimentaires ou au mucus intestinal formant ainsi

un biofilm, ou l'état planctonique, où les populations bactériennes évoluent de façon libre et isolée dans l'environnement colique [26].

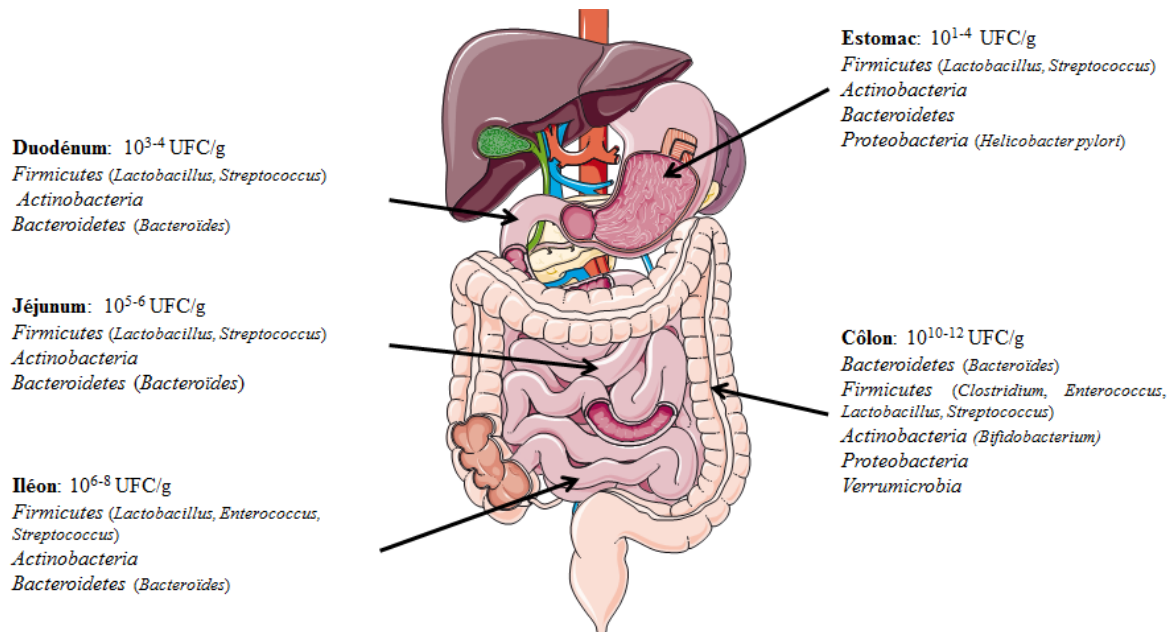


Figure 1.1 Composition de la flore bactérienne dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal (adapté de [18, 21, 24]).

1.1.2 L'établissement et l'évolution du microbiote colique au cours du temps

Le développement du microbiote est un processus complexe. Le nouveau-né, stérile *in utero*, se trouve exposé à une flore simple provenant de la flore fécale et vaginale de la mère et de l'environnement proche. Le nourrisson est rapidement colonisé par une succession de bactéries aérobies, de bactéries anaérobies facultatives, puis de bactéries anaérobies strictes [27-30]. Les premiers colonisateurs sont les entérobactéries, les coliformes, les lactobacilles et les streptocoques. Une fois que ces organismes aérobies/anaérobies ont consommé l'oxygène, diminuant ainsi le potentiel d'oxydo-réduction dans la lumière du tube digestif, les bactéries anaérobies strictes telles que les bifidobactéries, les *Bacteroides* et les clostridies s'implantent [29, 31, 32]. À cet instant, le microbiote colique est dominé par un ou plusieurs genres bactériens tels qu'*Escherichia*, *Clostridium*, *Bacteroides* et *Bifidobacterium*.

Après les six premiers mois de la vie, lorsque l'alimentation solide est introduite au nourrisson, le microbiote colique devient plus diversifié. La succession de *Bacteroides*, de *Clostridium* et des bactéries anaérobies augmente rapidement alors que la proportion de bifidobactéries devient plus stable [29, 31].

Une flore diversifiée et stable, proche de celles de l'adulte, ne semble être obtenue qu'entre 2 et 4 ans [33].

1.1.3 Les facteurs qui influencent le développement du microbiote colique

Différents facteurs influencent la composition et l'évolution du microbiote de l'enfant tels que le mode d'accouchement, l'environnement, le mode d'alimentation, le terme à la naissance et l'usage d'antibiotiques.

1.1.3.1 Le mode d'accouchement et le terme à la naissance

Les nourrissons nés par voie naturelle ont une flore différente de celle des nourrissons nés par césarienne [31]. Étant donné que les nourrissons nés par voie naturelle entrent en contact avec la flore vaginale et fécale maternelle, la colonisation de l'intestin s'effectue par des microbes provenant du canal de naissance de la mère, contrairement aux nourrissons nés par césarienne. Il a été montré lors d'un suivi d'une cohorte de nourrissons nés (par voie naturelle et par césarienne) que l'implantation de la flore anaérobie stricte était retardée pour les nourrissons nés par césarienne, ce retard portant principalement sur les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides* [28].

D'autres auteurs ont suggéré que l'intestin du nourrisson était plutôt colonisé suite à l'ingurgitation de liquide amniotique *in utero* [29] et par les microorganismes de l'environnement, tels que ceux du personnel de santé, des salles et d'autres nourrissons [34, 35].

Les nouveau-nés prématurés sont rapidement séparés de leur mère pour être mis dans un environnement de soins intensifs très aseptisé. Ils ont un développement semblable aux nouveau-nés issus de césarienne à terme et ont pour principale source de colonisation l'environnement qui les entoure [34].

1.1.3.2 Les habitudes alimentaires et d'hygiène

La composition du microbiote semble être influencée par la situation géographique, due aux différentes habitudes alimentaires dans une région ou un pays. Une récente étude a montré un "gradient géographique" dans le microbiote infantile à travers l'Europe du Nord [36]. En effet, les nourrissons du Nord ont montré des niveaux élevés de bifidobactéries, *Atopobium*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* alors que les nourrissons du Sud ont présenté une proportion plus élevée de *Bacteroides*, *Eubacteria* et *Lactobacillus*. La dynamique de colonisation est fortement conditionnée par l'hygiène qui entoure la naissance et les premiers moments de la vie. Ceci se démontre par exemple par la colonisation tardive des espèces commensales comme *Escherichia coli* dans les pays industrialisés par rapport aux pays en voie de développement, où les conditions d'hygiène sont différentes [37].

1.1.3.3 Le mode d'alimentation

Le mode d'alimentation, soit l'allaitement (lait maternel) ou l'alimentation avec du lait artificiel, a un effet important sur le microbiote du nourrisson. Durant l'allaitement, le transfert de microbiote se poursuit par le biais du lait maternel qui est une excellente source de bactéries comme de staphylocoques, de streptocoques, de bactéries lactiques (BL) et de bifidobactéries [38, 39]. De plus, le lait maternel contient une quantité appréciable d'oligosaccharides qui ne sont pas hydrolysés par les enzymes digestives humaines. N'étant donc pas assimilés par l'humain, ces oligosaccharides favorisent le développement des bifidobactéries [40, 41], et permet d'expliquer la colonisation dominante chez le nouveau-né par le genre *Bifidobacterium*.

Bien qu'il ait été montré que les nouveau-nés nourris avec du lait artificiel pouvaient avoir une colonisation et une prolifération équivalente en bifidobactéries totales à celle observée chez les nouveau-nés allaités, il semble y avoir une variation dans les espèces dominantes selon le mode d'allaitement privilégié [36, 42, 43].

Il a aussi été observé que le microbiote du nouveau-né nourri au lait artificiel était plus diversifié et similaire au microbiote adulte. Il est caractérisé par la prévalence d'anaérobies facultatifs comme *Bacteroides* et *Clostridium* suivi par *Staphylococcus*, *Streptococcus* et

Enterobacteriaceae et avec un déficit en bifidobactéries comparé à celui d'un nouveau-né nourri au lait maternel qui est dominé par les bifidobactéries [34, 44].

1.1.3.4 L'usage d'antibiotiques

Les antibiotiques causent des effets délétères sur le microbiote du nouveau-né. Une étude a montré que les enfants ayant reçus de la céfalexine avaient moins de bifidobactéries et une augmentation des entérocoques comparé aux enfants n'ayant pas reçu de traitements antibiotiques [45]. Une autre étude, évaluant l'impact de l'administration d'antibiotiques (Augmentin[®] (amoxicilline et acide clavulanique) suivi de Bactrimel[®] (triméthoprime et sulfaméthoxazole)) sur la colonisation du microbiote, a montré que le microbiote des nouveau-nés ayant reçu ce traitement était extrêmement instable jusqu'à l'âge de 1 mois, avec *E. coli* comme dominant au début de la colonisation. Cependant, la plus grande différence entre les microbiotes des nouveau-nés ayant reçu ou non ce traitement antibiotique est l'apparente absence des bifidobactéries dans le groupe traité. De plus, jusqu'au 5^e mois de l'enfant, aucune bifidobactérie n'est détectée ce qui montre l'effet prolongé des antibiotiques sur le microbiote [46].

1.1.4 Les interactions du microbiote avec l'hôte

Le microbiote intestinal, par sa présence permanente et son immense population, exerce des effets physiologiques dont les répercussions sur l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Il joue un rôle essentiel dans le maintien de la santé de l'hôte par le développement et la maturation du système immunitaire intestinal, la protection contre les microorganismes pathogènes, le développement de la structure et des fonctions du TGI et son apport au niveau de la nutrition et du métabolisme.

1.1.4.1 Le développement et la maturation du système immunitaire grâce au microbiote intestinal

La comparaison entre des animaux axéniques (exempts de germes) et des animaux conventionnels a permis de mettre en évidence le rôle du microbiote au niveau du développement et de la maturation du système immunitaire. Il a été montré dans un modèle de souris immunocompétentes que la colonisation intestinale stimulait la production d'IgA,

la différenciation des lymphocytes T_{H1} et T_{H17} , et le développement des lymphocytes T_{Reg} [47]. Il a été montré qu'un cocktail comprenant 46 souches murines de *Clostridium*, essentiellement des groupes IV et XIVa, avait amélioré la branche anti-inflammatoire du système immunitaire en engendrant la différenciation de lymphocytes T_{Reg} et en induisant l'expression d'interleukines 10 (IL-10) anti-inflammatoires [48]. Le polysaccharide A produit par *Bacteroides fragilis* a également démontré une induction de la production IL-10 [49]. La stimulation permanente du système immunitaire par le microbiote intestinal est en fait nécessaire non seulement pour son développement et sa maturation, mais également pour le maintien de l'homéostasie intestinale, de la fonction de barrière de l'épithélium ou encore de l'équilibre entre réponses pro- et anti-inflammatoires [50].

1.1.4.2 La protection de l'hôte par le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal fournit à son hôte une protection physique à l'invasion pathogène par une exclusion compétitive. Cette exclusion se fait par l'occupation des sites d'attachement, la consommation des nutriments et la production de substances antimicrobiennes. De plus, le microbiote stimule l'hôte à produire une variété de peptides antimicrobiens (PAM).

De nombreux PAMs sont produits dans le TGI comme des défensines, des cathélicidines et des lectines de type-C. Ce groupe diversifié de molécules a pour rôle principal de réguler la population et la composition du microbiote intestinal [51]. Les interactions entre les PAMs et le microbiote sont bidirectionnelles : les PAMs sont responsables de la perturbation structurelle des surfaces des bactéries pathogènes et commensales [51, 52], tandis que le microbiote et ses métabolites stimulent la production des différents types de PAMs.

Les cellules de Paneth, un type de cellule de l'épithélium de l'intestin grêle que l'on retrouve exclusivement au fond des cryptes, sécrètent de nombreux PAMs. Il a été montré que cette sécrétion est directement liée à la présence du microbiote intestinal. Pour atteindre de haut niveau d'expression de PAMs, il est nécessaire d'avoir la présence de l'ensemble de la population microbienne [53, 54]. La présence de certaines espèces bactériennes comme *Bacteroides thetaiotamicron* [53, 55] et *Listeria innocua* [53] ou bien la présence de

lipopolysaccharides [54, 55] permet l'induction de l'expression de ces peptides antimicrobiens, quand ceux-ci sont faiblement exprimés.

Les métabolites microbiens ont aussi la capacité d'induire l'expression de PAM. Il a été démontré que les acides gras à courtes chaînes (AGCCs) et l'acide lithocholique induisaient l'expression de la cathélicidine LL-37 [56, 57].

Certains PAMs (ex : défensine) sont initialement produits sous une forme inactive (ex : prodéfensine) et ont besoin d'un clivage protéolytique pour être activés. Les cellules de Paneth produisent la matrilysine, molécule permettant l'activation de la défensine. Une étude sur des souris sans germe a montré que la colonisation par *B. thetaiotaomicron* entraînait l'induction de l'expression de la matrilysine [58]. Ceci démontre une autre facette de la médiation entre le microbiote et l'induction des défenses antimicrobiennes de l'hôte.

Il apparaît clairement que la présence du microbiote ou de métabolites produits a la capacité d'induire l'expression des PAMs et de permettre leur activation afin de contribuer à la protection de l'hôte contre des pathogènes et aussi de maintenir l'homéostasie.

1.1.4.3 Le développement de la structure et des fonctions normales du tractus gastro-intestinal grâce au microbiote

Le nouveau-né vient au monde avec un système gastro-intestinal structurellement et fonctionnellement immature [59]. Le développement post-natal du TGI est influencé par de nombreux facteurs incluant le développement de la communauté microbienne intestinale [59, 60].

Il a été montré que les souris axéniques présentaient un système immunitaire immature. En effet, il a été observé une hypoplasie des plaques de Peyer, une réduction du nombre de lymphocytes intra-épithéliaux ainsi qu'une limitation dans les concentrations d'immunoglobulines sériques et dans la production de cytokines [50]. De plus, en absence de microbiote, il apparaît que la physiologie du tube digestif n'atteint pas sa maturité. Il en résulte une réduction de l'épaisseur de la muqueuse, de la taille des villosités et des bordures en brosse et aussi par une réduction du renouvellement de l'épithélium colique et la vitesse de production de cellules par crypte [61]. Il a aussi été démontré que les animaux axéniques

avaient une vascularisation de l'intestin plus faible, une couche de mucus plus importante et une réduction des activités enzymatiques digestives [62].

1.1.4.4 La nutrition et le métabolisme

L'étude de modèles animaux axéniques a permis de mettre en évidence le rôle du microbiote au niveau de la nutrition et du métabolisme de l'hôte. Les animaux n'ayant pas de microbiote avaient besoin d'un apport calorique de 20 à 30 % supérieur à celui d'animaux conventionnels, afin de maintenir leur masse corporelle [62]. Ceci s'explique par la capacité du microbiote colique à métaboliser les glucides, les protéines et lipides d'origine alimentaire (fibres alimentaires) non-digérés dans la partie supérieure du TGI ainsi que les sécrétions endogènes (mucopolysaccharides, débris cellulaires, stérols, enzymes) [63].

1.1.4.4.1 Le métabolisme des glucides

Les glucides arrivant au niveau du côlon sont sous la forme de glucides complexes résistants aux α -amylases de l'hôte. Le microbiote est particulièrement bien adapté pour l'utilisation de ces glucides complexes grâce à la contribution de différents groupes bactériens ayant des activités métaboliques complémentaires [64].

La première étape consiste à dégrader les glucides complexes en métabolites fermentaires (AGCCs et gaz principalement), et est réalisée par l'action enzymatique (polysaccharidases, glucosidases) des bactéries hydrolytiques [64]. Les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi que quelques espèces des genres *Enterococcus*, *Clostridium* et *Eubacterium* ont démontré une activité hydrolytique à l'égard des polymères glucidiques [65]. Les métabolites fermentaires, issus de l'hydrolyse des glucides complexes, peuvent être ensuite utilisés par des espèces dépourvues d'activité hydrolytique. Les substrats glucidiques simples sont catabolisés par le microbiote selon un nombre restreint de voies métaboliques.

La plupart des espèces bactériennes utilisent la glycolyse pour convertir les glucides en pyruvate. Le pyruvate, molécule centrale dans ces processus fermentaires, est ensuite transformé selon différentes voies métaboliques en produits finaux de fermentation (acétate, propionate et butyrate), qui sont rapidement utilisés par le microbiote ainsi qu'absorbés par

les cellules épithéliales de l'intestin et sont métabolisés dans différents organes (épithélium colique, foie, muscle, cœur). Un certain nombre d'espèces produit également d'autres métabolites secondaires (lactate, succinate, formate et éthanol) qui ne s'accumulent pas dans l'écosystème car ils sont ensuite métabolisés par d'autres espèces en produits finaux de fermentation [66].

1.1.4.4.2 Le métabolisme des protéines

Les protéines et les peptides sont les principales sources d'azote dans le côlon. Le microbiote doit hydrolyser ces molécules par le biais de nombreuses enzymes telles que des protéases, des désaminases et des transaminases pour disposer des carbones et de l'azote qui les composent [63]. Cette dégradation engendre des molécules potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, indoles, ammoniac, amines) [63].

Suite à la protéolyse des protéines par des espèces ayant une activité protéasique (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*), les peptides générés peuvent être assimilés par plusieurs espèces bactériennes. Suite à cette utilisation, il en résulte souvent une excrétion d'acides aminés libres non nécessaires à la croissance de ces bactéries. Ces acides aminés libres peuvent être utilisés par des espèces n'ayant pas la capacité d'assimiler les peptides [63]. La désamination des acides aminés conduit généralement à la formation d'AGCCs (acétate, propionate et butyrate) et d'ammoniac. D'autres composés sont aussi produits lors de la métabolisation des acides aminés comme des composés phénoliques et indoliques, des acides gras ramifiés (isobutyrate, isovalérate) et des acides dicarboxyliques [67]. Les composés phénoliques et indoliques sont absorbés par la muqueuse colique, détoxifiés puis excrétés dans les urines [67]. L'ammoniac est aussi l'une des principales sources d'azote pour le microbiote. Ainsi le microbiote utilise l'ammoniac pour sa protéosynthèse, et par conséquent, diminue la concentration en ammoniac dans la lumière intestinale, le surplus étant absorbé par les muqueuses intestinales et envoyé au foie pour être converti en urée et être éliminé dans les urines [67].

1.1.4.4.3 Le métabolisme des lipides

Les lipides présents au niveau du côlon, sont issus de l'alimentation, des lipides bactériens et de la desquamation de colonocytes [68]. Le microbiote transforme les acides gras via différentes réactions d'hydrolyse, d'oxydation et de réduction [69]. De nombreuses espèces du microbiote possèdent des lipases permettant l'hydrolyse de triglycérides à longues chaînes [69]. Cependant, une étude a montré que le microbiote n'était pas capable de métaboliser toutes les longueurs de chaînes d'acides gras (particulièrement celles de 20 à 22 carbones) [70]. Il a été montré que le microbiote était capable de convertir le cholestérol en coprostanol, une molécule qui n'était pas absorbée par l'hôte et qui était éliminée dans les fèces, ce qui permet de diminuer le taux de cholestérol dans le sang de l'hôte [71].

1.1.5 Techniques d'étude de la diversité bactérienne du microbiote intestinal

Plusieurs méthodes sont aujourd'hui disponibles pour l'évaluation de la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal. Traditionnellement, des méthodes de culture étaient utilisées. Avec cet outil, il a été possible de faire des progrès dans le phénotypage des isolats sur la base de leurs profils de fermentation et sur leurs exigences de croissance *in vitro*. Bien que l'identification bactérienne par culture soit peu coûteuse, elle demande beaucoup de temps et de main d'œuvre et ne prend en compte qu'une partie du microbiote intestinal car seulement 30 % du microbiote sont cultivables [21, 72].

Depuis les années 1990, des méthodes indépendantes de la culture bactérienne ont été développées et utilisées tant pour évaluer la diversité du microbiote que pour quantifier les espèces composant le microbiote. Elles ont ainsi permis de révéler une plus grande complexité du microbiote intestinal. La majorité de ces techniques est basée sur les gènes codant l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), des gènes hautement conservés au sein des espèces bactériennes et présentant des régions suffisamment variables pour permettre une identification au niveau de l'espèce [73]. Ces méthodes incluent la réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (qPCR), l'électrophorèse sur gel en présence d'un gradient d'agent dénaturant (DGGE) ou d'un gradient de température (TGGE), l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments terminaux (T-RFLP), l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), les puces ADN, et les méthodes de séquençage (Tableau 1.1)

Tableau 1.1 : Techniques utilisées pour l'étude du microbiote intestinal.

Technique	Description	Avantages	Inconvénients
Méthode culturale	Isolation de bactéries sur milieux sélectifs	Peu coûteux Semi-quantitative	Fastidieux 30% du microbiote cultivable
qPCR	Amplification et quantification de l'ARNr 16s	Identification phylogénétique, Quantitative Rapide	Biais d'extraction et d'amplification d'ADN Ne permet pas d'identifier des espèces inconnues
DGGE/TGGE	Séparation sur gel d'amplicons d'ARNr 16s par dénaturation ou avec la température	Rapide Semi-quantitative, Bandes peuvent être excisées pour des analyses complémentaires	Biais d'extraction et d'amplification d'ADN Identification phylogénétique impossible
T-RFLP	Digestion d'amplicons d'ARNr 16S marqué par un fluorochrome et séparation sur gel	Rapide peu coûteux Semi-quantitative	Biais d'extraction et d'amplification d'ADN Identification phylogénétique impossible Basse résolution
FISH	Hybridation d'amorces fluorescentes avec l'ARNr 16S	Identification phylogénétique Semi-quantitative Pas de biais d'extraction et d'amplification d'ADN	Ne permet pas d'identifier des espèces inconnues
Puce à ADN	Hybridation entre des sondes d'oligonucléotides et un échantillon marqué par un fluorochrome, la fluorescence est détectée par laser	Identification phylogénétique Rapide Semi-quantitative	Biais d'extraction et d'amplification d'ADN Limite de détection
Séquençage de clone d'amplicon d'ARNr 16S	Clonage de l'ARN 16S, méthode Sanger, électrophorèse capillaire	Identification phylogénétique	Biais d'extraction et d'amplification d'ADN Laborieuse Biais de clonage
Séquençage direct d'amplicons d'ARNr 16S	Séquençage haut débit d'amplicons d'ARNr 16S (454, SOLiD, Illumina)	Identification phylogénétique Rapide Semi-quantitative (abondance) Identification de bactéries inconnues	Biais d'extraction et d'amplification d'ADN Laborieuse Coûteuse
Séquençage shotgun du microbiome	Séquençage haut débit du génome entier	Identification phylogénétique Semi-quantitative (abondance)	Coûteuse Analyses intenses des données par bio-informatique

1.1.5.1 La PCR en temps réel (qPCR)

La PCR quantitative, ou PCR en temps réel, permet la quantification de différents phylums ou différentes espèces du microbiote [74, 75]. Bien que cette méthode soit rapide et relativement peu coûteuse, elle ne permet pas de quantifier l'intégralité du microbiote car seuls les phylums/espèces ciblés par les amorces le seront. De plus, elle ne distingue pas les cellules viables des non viables, à moins qu'un agent intercalant inhibiteur de PCR tel que le propidium monoazide ne soit utilisé. Ce dernier étant capable d'atteindre et de se fixer au matériel génétique des cellules endommagées empêche leur amplification par qPCR et donc leur quantification [76].

1.1.5.2 Les techniques d'empreintes moléculaires

Les techniques d'empreintes moléculaires (DGGE, TGGE et T-RFLP) offrent une vision globale sur le profil des populations microbiennes par comparaison du polymorphisme des amplicons d'ADN issus d'un échantillon.

La DGGE est une technique d'électrophorèse en condition dénaturante (généralement, urée) qui permet de séparer les multiples amplicons issus d'un échantillon en fonction de leur poids moléculaire et de leur séquence. Ces amplicons peuvent ensuite être extraits du gel pour être séquencés [77]. La TGGE est une méthode similaire mais basée sur un gradient de température [78, 79]. Ces deux méthodes ne permettent pas ou difficilement l'identification phylogénétique des échantillons.

La T-RFLP est une méthode basée sur la digestion des amplicons par des endonucléases de restriction [80]. Un profil de l'échantillon est obtenu après séparation par électrophorèse en condition non dénaturante. Cette méthode est principalement utilisée pour évaluer la diversité et comparer la variabilité du microbiote [80, 81]. Bien que cette méthode soit rapide et relativement peu coûteuse, sa limite de détection est relativement haute.

1.1.5.3 Les techniques d'hybridation

Les techniques d'hybridation (FISH et puces à ADN) sont basées sur la complémentarité entre des sondes oligonucléotidiques spécifiques et des séquences cibles de l'ADN bactérien.

Les sondes utilisées pour le FISH sont marquées avec un fluorochrome. Une fois l'hybridation effectuée, les espèces ciblées par les sondes peuvent être énumérées manuellement à l'aide d'un microscope optique ou par cytométrie de flux [82, 83]. Au même titre que la qPCR, le FISH ne permet pas de quantifier les espèces inconnues et ne distingue pas les cellules viables des non viables.

Les puces à ADN sont constituées de sondes d'oligonucléotides immobilisées sur une matrice solide telles qu'une lame de verre. L'hybridation entre l'échantillon préalablement marqué par un fluorochrome et les sondes induit une fluorescence détectable par un laser. Cette technologie fournit une identification phylogénétique du microbiote intestinal [84] qui est principalement utilisée pour comparer différents microbiotes [85, 86]. La principale limite de cette méthode réside dans sa limite de détection relativement haute.

1.1.5.4 Les méthodes de séquençage

Les méthodes de séquençage (séquençage à partir de banques de clones d'ARNr 16S, d'amplicons d'ARNr 16S et d'ADN génomique) ont pour but de déterminer, à l'aide de la séquence d'acides nucléiques, l'identité des membres d'un écosystème d'intérêt.

Le séquençage de banques de clones d'ARNr 16S nécessite d'abord la production de clones. Le séquençage des inserts permet d'identifier et de déterminer l'abondance du microbiote intestinal [87], mais, compte tenu de la possibilité de ne séquencer qu'un seul insert à la fois, la profondeur de séquençage reste la limitation majeure de cette méthode [88, 89].

Les méthodes de séquençage à haut débit développées depuis les années 2000 permettent d'éliminer l'étape de clonage de la précédente méthode et sont effectuées à partir d'amplicons (séquençage direct d'amplicons d'ARNr 16S) ou directement d'ADN génomique total (aussi appelé métagénomique du microbiome). Ces méthodes se résument en trois étapes : la

préparation et l'amplification des échantillons à analyser (amplicons d'ARNr 16S ou ADN), ensuite l'incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer enfin la lecture de la séquence.

Les principales technologies de séquençage à haut débit (next-generation sequencing, NGS) utilisées actuellement sont les systèmes Life Sciences 454, Life Technologies avec son système ABI SOLiD, et Illumina (Solexa). Ces différentes technologies permettent l'identification phylogénétique, l'abondance microbienne (semi-quantitative) mais elles sont très laborieuses, coûteuses et demandent beaucoup de travail de traitements de données.

La technologie Roche 454 est basée sur le pyroséquençage. Le matériel génétique est fragmenté puis un seul fragment est fixé sur une bille. Il s'en suit une étape d'amplification par PCR en émulsion. Le mélange obtenu est ensuite déposé sur une plaque. La réaction de séquençage par synthèse est alors initiée base par base. La lecture de chaque base incorporée est révélée à l'aide d'une réaction chemoluminescente et détectée par une caméra [90, 91]. Cette méthode a été utilisée par exemple dans l'évaluation de l'impact d'antibiotique sur le microbiote intestinal [92] et dans le projet du microbiome humain [93]. C'est une méthode rapide et une longueur de lecture de 700 bp mais qui comporte certains inconvénients comme un haut taux d'erreurs de lecture lorsqu'il y a présence d'homopolymères ($nt \geq 6$) et un faible débit comparé aux autres technologies (NGS).

La technologie Applied Biosystems SOLiD est basée sur le séquençage par ligation. L'étape d'amplification est identique à celle du pyroséquençage. Par contre, les séquences amplifiées sont fixées sur un support solide au lieu d'une plaque. La réaction de séquençage s'effectue ensuite par un système assez complexe de cycles de ligation et de clivage [90, 91]. Cette méthode a été utilisée pour l'étude du microbiote intestinal [94]. Son principal avantage est la précision du séquençage mais a pour inconvénient la longueur des lectures (75 bp).

La technologie Illumina est basée sur le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles. L'amplification de l'échantillon s'effectue sur un support solide. La réaction de séquençage se déroule position après position en ajoutant un mélange contenant toutes les bases associées

chacune à un fluorophore différent. L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante. La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle [90, 91]. Cette méthode a été utilisée pour l'étude comparative de microbiote [95] et dans le projet du microbiome humain [93]. Cette méthode a comme principal inconvénient la longueur des lectures (150 bp).

1.1.6 Modèles *in vitro* de fermentation pour étudier le microbiote colique

De nombreux modèles de fermentation *in vitro* ont été proposés afin de simuler le microbiote colique humain. Ces modèles présentent une opportunité inégalée pour la réalisation d'études souvent contestées chez les humains et les animaux en raison des préoccupations éthiques. La conception et la complexité de ces systèmes *in vitro* de fermentation ont engendré une multitude de modèles allant de simples modèles en «batch» à des modèles en continu avec plusieurs niveaux avec une multitude de technique d'inoculation fécale [96-100]. L'usage de ces modèles permet d'étudier un microbiote intestinal complet et stable pendant une période de temps définie et spécifique au modèle utilisé. La sélection du modèle approprié nécessite une évaluation minutieuse des objectifs de l'étude étant donné les avantages et les limites exposés par chacun des types de système (tableau 1.3)

1.1.6.1 Les systèmes de fermentation en «batch»

Les fermentations en «batch» sont des modèles statiques et décrivent la croissance d'une suspension bactérienne dans un milieu sélectionné. Ces modèles sont généralement constitués de bouteilles refermant une suspension de matières fécales et du milieu étudié dans des conditions anaérobies. Ces modèles sont utilisés pour l'évaluation de l'utilisation de certains composants alimentaires tels que des polysaccharides ou des fibres comme potentiels prébiotiques [101, 102]. Ils sont aussi utilisés pour l'étude des profils métaboliques des AGCCs résultant de la métabolisation des composés alimentaires par le microbiote intestinal [98, 103]. Ces systèmes sont faciles d'utilisation, peu coûteux ce qui permet de tester rapidement un grand nombre de substrats et/ou d'échantillons fécaux. Par contre, certains

aspects négatifs sont liés à l'utilisation de ces systèmes comme une accumulation de composés tels que les AGCCs qui entraîne une modification continue du pH et du potentiel redox. En effet, ces systèmes ont certaines limites comme une absence du contrôle du pH, une vitesse d'épuisement qui dépend de la taille de l'inoculum et du substrat. Ces limites ont pour conséquence un usage limité à de courtes durées (24-48h).

1.1.6.2 Les systèmes de fermentation en continu

Les modèles de fermentation en continu peuvent être soit avec un seul ou plusieurs réacteurs en série et sont nécessaires pour réaliser des études à long terme étant donné qu'il y a un renouvellement du substrat et l'élimination des composés toxiques en continu. Les modèles avec un réacteur unique sont souvent utilisés pour élucider dans une partie spécifique du côlon (proximal ou ascendant) l'activité métabolique du microbiote. Ils ont aussi été utilisés pour étudier le mécanisme d'infection de *Salmonella* chez les enfants [104], la colonisation de l'intestin du nourrisson [96] ainsi que l'activité inhibitrice de composés antimicrobiens contre des souches pathogènes [105].

Il a été démontré que les fonctions du côlon humain dépendaient de la région du colon (partie ascendante, transversale ou descendante) car on y observait des différences au niveau de l'activité métabolique et de la composition du microbiote [106]. Un des avancements majeurs dans les modèles de fermentation *in vitro* a été le développement de modèles de fermentation à réacteurs multiples qui sont capable de simuler la totalité du côlon [107]. Ce modèle permet de recréer les propriétés spatiales, temporelles, nutritionnelles et physicochimiques du microbiote humain par la combinaison de trois réacteurs connectés en série et qui reproduit la partie proximale, transverse et distale du côlon [107]. L'adaptation, la survie et la prolifération d'un microbiote issu d'un humain aux conditions du modèle *in vitro* de fermentation en continu sont dépendantes des paramètres environnementaux comme le pH, le temps de rétention, la température, l'anaérobie et le débit du milieu de culture. La maîtrise de ces facteurs permet l'établissement d'un état d'équilibre de la composition et de l'activité métabolique du microbiote, et cet état d'équilibre est nécessaire pour créer un modèle reproductible. De nombreuses d'études et de nouveaux résultats sur la modulation de la

communauté microbienne et de l'activité métabolique ont été obtenues en utilisant ces modèles de fermentation en continu à plusieurs étages [97, 99, 107, 108]. Le principal facteur de discrimination de ces modèles est la technique utilisée pour l'inoculation fécale. La plupart des systèmes *in vitro* utilise une suspension fécale liquide comme inoculum. Il en résulte plusieurs limitations dues à l'état acellulaire des populations bactériennes [96]. Les systèmes avec un inoculum fécal liquide connaissent généralement un lavage rapide des bactéries moins compétitifs et sont par conséquent limités dans le temps opérationnel à moins de 4 semaines [107, 109, 110]. Ces systèmes ont également du mal à reproduire à la fois l'état planctonique (acellulaire) et l'état sessile (biofilm) des populations bactériennes dans le côlon [98, 111]. Pour résoudre les problèmes liés au lavage de l'inoculum, un processus d'immobilisation du microbiote fécal a été développé [96, 97, 108]. Ici, le microbiote fécal est mis en suspension dans une matrice de polysaccharides poreux conduisant à la formation de perles de matières fécales, qui sont transférées dans le milieu de croissance d'un modèle de fermentation en continu. Ces perles permettent d'obtenir une haute densité cellulaire [96, 112-114]. Le temps opérationnel de ces systèmes utilisant des cellules immobilisées pouvaient atteindre des durées de 29, 54 et jusqu'à 71 jours [96, 97, 115].

Certains modèles de fermentation en continu ont essayé d'aller plus loin dans l'ajout de paramètres supplémentaires comme le modèle du TIM-2 ou le modèle SHIME. Dans le modèle TIM-2, il y a l'ajout de fonctions reproduisant les mouvements péristaltiques et l'absorption d'eau et de métabolites du côlon [116]. Le modèle SHIME comprend une série de cinq réacteurs qui reproduit le duodénum/jéjunum, l'iléon et les trois parties du côlon [117].

Malgré les nombreux modèles permettant d'effectuer des fermentations intestinales *in vitro*, plusieurs difficultés et limites ont été exposées pour cette technologie. La reproductibilité et la stabilité métabolique du microbiote intestinal dans ces modèles *in vitro* sont souvent contestées. La robustesse de chaque modèle dépend de la certitude que les effets observés sur la composition ou l'activité métabolique du microbiote sont uniquement dues aux traitements expérimentaux appliqués et non à l'adaptation à l'environnement du modèle [99]. L'inoculation et la colonisation du système influencent l'équilibre du nouveau microbiote

Tableau 1.2 : Avantages et limites des modèles *in vitro* de fermentation [118].

Modèles	Avantages	Limites	Réfs
Culture en «batch»	Simple d'utilisation Étude sur la digestion de composant alimentaire Étude sur le métabolisme du microbiote	Usage limité à de courtes durées Pas de contrôle microbiologique	[101, 102]
Culture en continu	Conditions continues imitant le <i>in vivo</i> Contrôle des paramètres environnementaux	Aucune fonctionnalité de l'hôte Expériences sont limitées temps (jours ou semaines)	[119, 120]
Culture en continu à étages multiples	Conditions continues dans plusieurs réacteurs imitant les différentes parties du côlon	Aucune fonctionnalité de l'hôte Expériences sont limitées temps (jours ou semaines)	[99, 120]
Culture en continu avec immobilisation	Haute densité cellulaire Stabilité à long terme	Aucune fonctionnalité de l'hôte	[104, 108]
Système artificiel de digestion (TIM-2, SHIME)	Conditions continues imitant le <i>in vivo</i> Absorption des métabolites et de l'eau	Aucune réponse immunitaire et neuro-endocrinienne Limite de temps de quelques jours	[121, 122]

intestinal produit. En effet, les facteurs environnementaux du système *in vitro* ainsi que la diversité qualitative initiale de l'inoculum sont responsables des variations observées sur les ratios des populations bactériennes entre le modèle *in vitro* et *in vivo* chez l'humain [86, 99]. Ces changements observés reflètent les conditions appliquées dans les modèles *in vitro* (par exemple : temps de rétention, milieu de culture, pH, etc.) qui ne peuvent jamais être une simulation absolue des conditions rencontrées chez l'hôte. De plus, la limitation majeure de ces modèles est l'incapacité de simuler les principales fonctions de l'hôte [118].

1.1.7 La perturbation du microbiote adulte

Le stress, la diète et l'usage d'antibiotiques peuvent entraîner la modification du microbiote et de ses activités métaboliques. Ces perturbations peuvent avoir des effets délétères sur la santé de l'hôte.

1.1.7.1 Le stress

Chez les jeunes primates, la première séparation d'avec la mère engendre un stress qui provoque un déséquilibre dans la composition de leur flore fécale indigène. En effet, une brève augmentation du nombre de lactobacilles dans les fèces le premier jour post-séparation a été remarquée, suivie d'une diminution de la concentration de ces lactobacilles trois jours plus tard. Selon cette étude, au bout d'une semaine, la flore des jeunes primates était redevenue normale. Par contre, le schéma inverse a été remarqué dans le cas des bactéries à Gram négatif retrouvées dans les échantillons fécaux des jeunes primates [123]. Cette étude montre bien l'impact engendré par le stress de la séparation sur la flore de ces primates.

1.1.7.2 La diète

La diète, définie comme l'ensemble des aliments ingérés par l'hôte, semble avoir un impact significatif sur la composition et le métabolisme du microbiote humain. Certaines diètes ou constituants de cette diète ont la capacité de promouvoir la croissance d'organismes bénéfiques mais aussi dans certains cas de favoriser des microorganismes ayant des effets nocifs pour la santé de l'hôte [124]. Parmi ces molécules, les aliments comportant des

composés soufrés [65, 125, 126], les aliments hautement protéiques [67, 127] ou les aliments riches en sucres simples ou raffinés [128-130].

1.1.7.3 Les antibiotiques

L'usage d'antibiotiques est la cause majeure d'altération (déséquilibre, diminution, etc) du microbiote colique [131, 132]. La présence d'antibiotiques dans l'intestin est attribuable à son mode d'administration. Lors d'une administration par voie orale, leur présence dans l'intestin est due à une absorption incomplète. Dans le cas d'une administration parentérale, leur présence est due à une sécrétion par les glandes salivaires (salive), le foie (la bile) ou par la muqueuse intestinale dans l'intestin. [132].

Cette présence résiduelle d'antibiotiques dans l'intestin est responsable de la modulation du microbiote colique. Le microbiote subit une perturbation de ses fonctions et de son métabolisme, tout particulièrement une réduction du niveau de production d'AGCCs [133]. Les cellules de la muqueuse absorbent moins de sodium et d'eau, ce qui contribue à l'apparition de diarrhée [133].

Le déséquilibre provoqué par les antibiotiques permet aux microorganismes opportunistes ou pathogènes de se développer [131]. En effet, il a été observé, suite à un traitement antibiotique dans un modèle animal, que la résistance à la colonisation avait diminué, ce qui contribue à une augmentation de la susceptibilité aux pathogènes intestinaux [134], conduisant à l'apparition d'infections gastro-intestinales, de diarrhées associées aux antibiotiques [135], d'infections à *Clostridium difficile* [136, 137], de colites pseudomembraneuses [138], de colites ulcéraives [139] et de cancer du côlon [140].

1.2 *Clostridium difficile*

1.2.1 Historique

Clostridium difficile est un bacille à Gram positif appartenant à la classe des Firmicutes, anaérobie strict et sporulant qui a été pour la première fois identifié en 1935 par Hall et O'Toole. Il était initialement nommé *Bacillus difficilis* en raison de la difficulté à le cultiver. Le spécimen était issu de la flore colique de nouveau-nés en bonne santé [141]. Étant donné que la souche avait été isolée d'enfants en bonne santé, il n'y avait pas de raison de penser qu'elle pouvait avoir des effets délétères sur l'homme. De plus, il est maintenant démontré que les enfants peuvent être colonisés par cette souche qui peut persister pendant les 2 premières années de leur vie [142]. Rapidement, cette équipe a observé que cette souche produisait une toxine létale pour les rongeurs [141]. À ce moment, aucun lien n'était établi entre cette souche et les cas de colique pseudomembraneuse (CPM), la marque propre d'une infection à *C. difficile*. Cette pathologie était en effet rare avant l'usage répandu des antibiotiques au début des années 1950 [2]. Les rapports sur les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques et des CPMs sont ensuite devenus de plus en plus fréquents. À cette époque, *Staphylococcus aureus* résistant aux antibiotiques fut désigné comme l'organisme responsable de ces complications [143]. À partir des années 1970, l'idée que certaines bactéries du tractus gastro-intestinal jouaient un rôle dans la pathogénèse de CPM a peu à peu émergé [144]. En effet, Tedesco et ses collaborateurs ont montré dès 1974 une forte relation entre la prise de clindamycine et la CPM qu'ils nommeront «colique à clindamycine». L'administration de vancomycine offrait par contre une protection contre ses «coliques à clindamycine»[145]. À la fin des années 1970, le postulat que *S. aureus* était responsable des CPMs associées à la prise d'antibiotiques n'était plus de rigueur et une série d'investigations ont permis de mettre en avant l'implication de *C. difficile* [146] et de sa toxine clostridique sur les effets cytopathiques sur le TGI [147, 148].

Les manifestations d'une ICD peuvent être de différents niveaux de gravité allant d'une colonisation asymptomatique à une diarrhée légère, jusqu'à des maladies plus sévères incluant la colique pseudomembraneuse, le mégacôlon toxique, la septicémie et la mort dans le pire des cas [149]. Une fois que l'agent responsable fut identifié, le suivi, le management

et le traitement des infections à *C. difficile* fut plus facile. Jusqu'au début du 21^e siècle, les ICDs étaient considérées comme une complication traitable par antibiotiques et non comme un problème majeur de la santé publique. Cependant, depuis les 10 dernières années, la gravité et la fréquence des ICDs ont augmenté, au même titre que leur résistance aux traitements standards [150]. Cette recrudescence d'ICD est essentiellement due à l'apparition d'une souche particulièrement virulente, *C. difficile* NAP-1/B1/027. Cette souche est impliquée dans de nombreux cas rencontrés en Europe et en Amérique du Nord [151], produit d'importantes quantités de toxine A et B [151] et est résistante aux fluoroquinolones [150].

1.2.2 Les mécanismes de toxicité (pathogénicité et virulence)

Le principal facteur de virulence de *C. difficile* est la production de 2 puissantes exotoxines, la toxine A (TcdA) et la toxine B (TcdB), qui induisent une inflammation de la muqueuse et des diarrhées [152, 153]. En sus, certaines souches de *C. difficile* produisent une toxine binaire (CDT) constituée de 2 composantes, CDTa et CDTb [154], qui provoque une dépolymérisation du cytosquelette d'actine entraînant la production de microtubules sur les protubérances des cellules épithéliales et ainsi augmentant l'adhérence des bactéries [155].

1.2.2.1 Les toxines A et B

La toxine A, une entérotoxine de 308 kDa, et la toxine B, une cytotoxine de 269,6 kDa, font partie de la famille des "large clostridial toxin" (LCT) [156]. Les LCTs sont des monoglycosyltransferases qui inactivent les Rho-GPTases. La glycolysation bloque ces protéines sous une conformation inactive qui entraîne le blocage des activités cellulaires qui nécessitent les Rho-GPTases [156].

Les toxines A et B sont encodées par les gènes *tcdA* et *tcdB* localisés dans une région de 19,6 kb sur le chromosome connue sous le nom de locus PaLoc pour locus de pathogénicité (Figure 1.2) [157]. La région PaLoc contient aussi trois autres gènes : *tcdR* et *tcdC*, qui codent des protéines impliquées dans la régulation de l'expression de TcdA et TcdB, et *tcdE*, qui code une protéine impliquée dans la sécrétion des toxines hors de la cellule. TcdR est un facteur sigma critique pour l'expression des gènes des toxines [158], TcdC est un facteur anti-sigma qui est un régulateur négatif de la production des toxines [159].

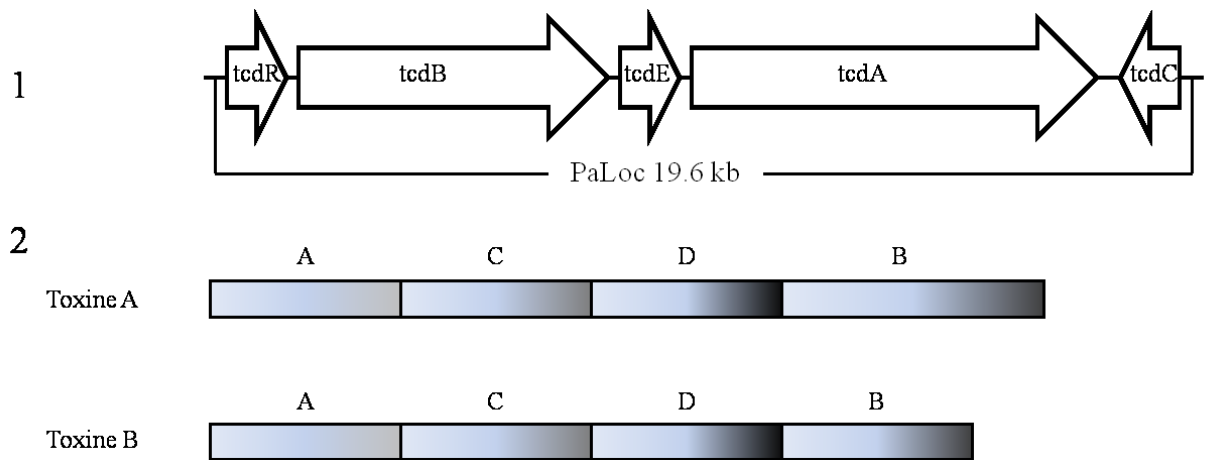


Figure 1.2 Représentations schématiques de (1) la région PaLoc (19,6 kb) contenant les gènes codant la toxine A et la toxine B et (2) l'organisation des domaines des toxines A et B de *C. difficile*. Les toxines A et B sont constituées de 4 domaines : le domaine N-terminal où se situe l'activité biologique (glycosyltransférase) (A), le domaine C-terminal permettant l'adhésion de la toxine (B), le domaine permettant le clivage auto-catalytique (cystéine protéase) (C) et le domaine hydrophobique permettant la translocation de la toxine (D) (adapté de [156, 160]).

Le mode d'action des toxines de la famille LCT (Figure 1.3) commence par la liaison de la partie C-terminale de la toxine avec un des nombreux récepteurs présents sur la surface des cellules épithéliales de l'intestin. Une fois que la liaison est établie avec le récepteur, les toxines pénètrent dans la cellule par endocytose puis fusionnent avec ses endosomes par les cellules infectées [156]. L'acidification de l'endosome est requise pour la translocation des toxines dans le cytosol de la cellule hôte. La TcdA ainsi que la TcdB sont en effet capables de former des pores à bas pH. Pour la TcdA, la formation est dépendante de la présence de cholestérol, tandis que dans le cas de la TcdB, sa capacité à former des pores est liée à sa région hydrophobique [160]. Suite à la formation des pores, la liaison de l'inositol hexakisphosphate conduit à un changement de conformation du domaine de la cystéine protéase de la toxine, résultant en un clivage auto-catalytique de l'emplacement situé entre la glucosyltransférase et le domaine de la cystéine protéase de la toxine, entraînant la libération du domaine actif de la glucosyltransférase dans le cytosol [161]. L'inactivation des Rho-GPTases par les TcdA et TcdB engendre de profonds effets sur la cellule dont la perte d'intégrité structurale de la cellule infectée due à une baisse de la quantité d'actine, résultant

de la dérégulation de la dépolymérisation de l'actine. Il en résulte une mort cellulaire par apoptose [153, 162]. La perturbation du cytosquelette d'actine induite par la toxine et la mort des colonocytes conduisent à la perte de la fonction barrière de l'épithélium intestinal et à l'altération des jonctions serrées des entérocytes. Suite à l'exposition aux toxines, les cellules épithéliales de l'intestin secrètent un certain nombre de cytokines, ce qui conduit à l'activation de neutrophiles, de mastocytes, des nerfs entériques et des neurones sensoriels à l'intérieur de la *lamina propria* intestinale [163]. Il en résulte une sécrétion de neuropeptides et de cytokines pro-inflammatoires, ce qui amène à une profonde réponse inflammatoire qui ne fait que compromettre davantage la fonction barrière de l'épithélium [163]. La perte de la fonction barrière épithéliale engendre une augmentation de la perméabilité intestinale et une accumulation de fluide et donc l'apparition de la diarrhée caractéristique d'une infection à *C. difficile* [164].

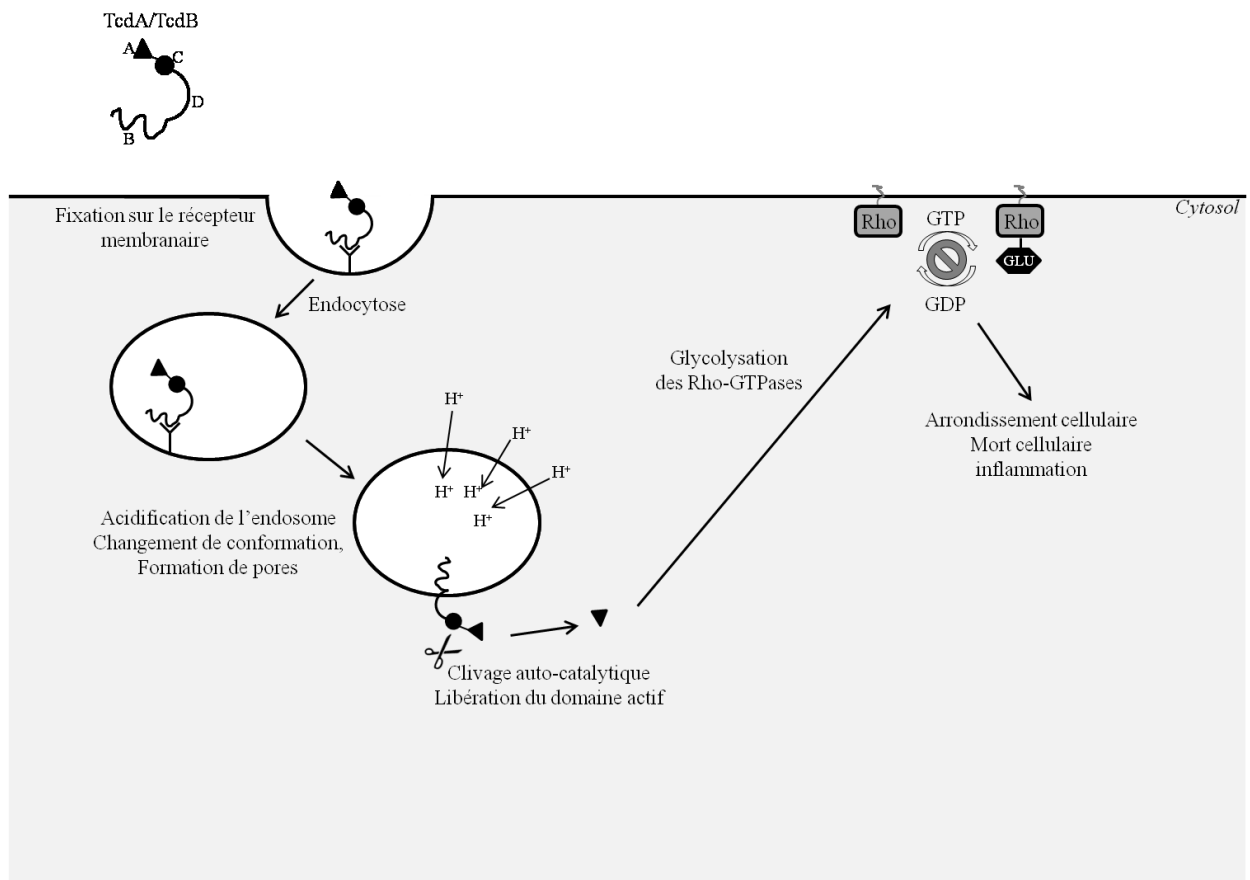


Figure 1.3 Mode d'action des toxines A et B (adapté de Shen [162]).

1.2.2.2 La toxine binaire

La CDT fait partie de la famille des toxines binaire "ADP-ribosylation". Cette toxine est constituée de deux composantes de toxine séparées. La première, CDTa (48 kDa), est la composante bioactive et possède l'activité ribosyl-transférase qui modifie l'actine. La seconde composante, CDTb (74 kDa), est impliquée dans l'ancrage de la toxine avec la cellule hôte et est responsable de la translocation de la première composante dans le cytosol [165]. Il a été démontré que l'ancrage se faisait avec le récepteur de lipoprotéines activé par la lipolyse (LSR) [166].

CDTa et CDTb sont encodées par les gènes *cdtA* et *cdtB* localisés dans une région de 6,2 kb du chromosome nommée Cdt locus ou CdtLoc. En plus de ces gènes *cdtA* et *cdtB*, la région CdtLoc contient aussi un autre gène : *cdtR* qui code une protéine de régulation (Figure 1.4) [167].

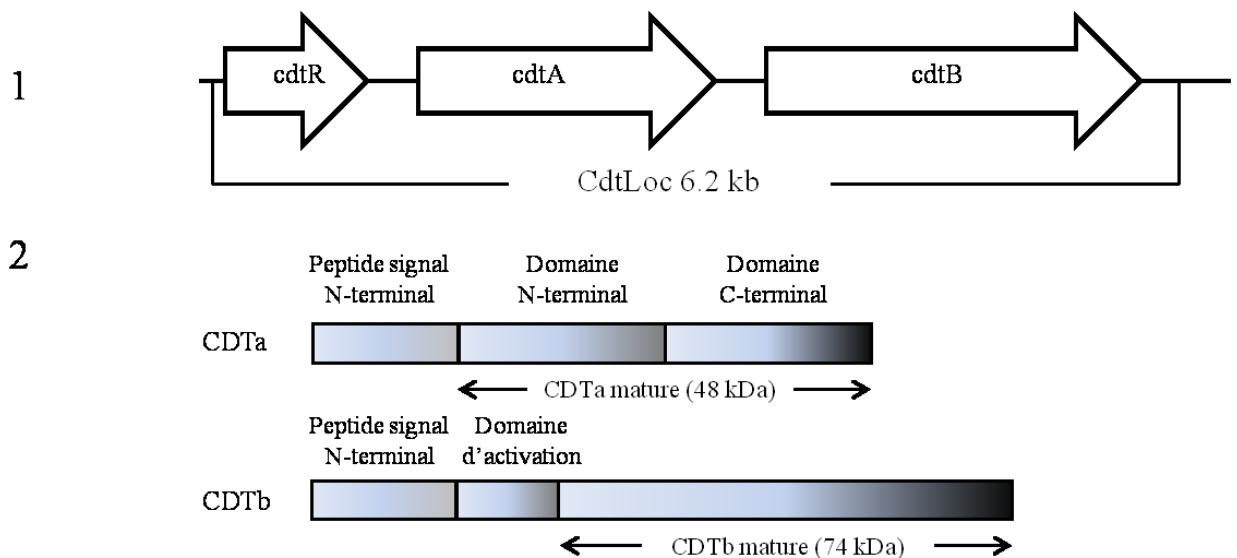


Figure 1.4 Représentations schématiques de (1) la région CdtLoc (6,2 kb) contenant les gènes codant la toxine binaire et (2) l'organisation des domaines des toxines CDTa et CDTb de *C. difficile* (adapté de [165, 167]).

Le mode d'action de cette toxine binaire est présenté à la figure 1.5. Premièrement, un clivage protéolytique de la CDTb entraîne la formation d'heptamère de CDTb. L'heptamère se lie au récepteur LSR qui se situe à la surface de la cellule. Il est aussi possible que la formation de l'heptamère succède à l'attachement d'un monomère au récepteur LSR. Par la suite, le CDTa

interagit avec le complexe de CDTb pour l'internaliser. Le bas pH de l'endosome permet au complexe de se lier à la membrane de l'endosome et de former un pore [168]. Grâce à ce pore, CDTa est transloquée dans le cytosol. Ce procédé est dépendant d'un système chaperon dans le cytosol comme celui des protéines de choc thermique (Heat shock protein, HSP) [169]. Dans le cytosol, CDTa ADP-ribolyse l'actine [170]. L'actine ADP-ribosylée ne pouvant pas se polymériser, se retrouve sous sa forme monomère. De plus, l'actine ADP-ribosylée agit comme une protéine de coiffage pour bloquer la polymérisation aux extrémités de l'actine F ce qui provoque une dépolymérisation du cytosquelette d'actine. Une dépolymérisation de l'actine corticale, qui est située au-dessous de la membrane cellulaire, est effectuée et se traduit par la formation de longues saillies où sont basées des microtubules. Ces protubérances forment un réseau sur la surface des cellules épithéliales, ce qui augmente l'interface d'interaction et améliore l'adhésion et la colonisation de *C. difficile* [171].

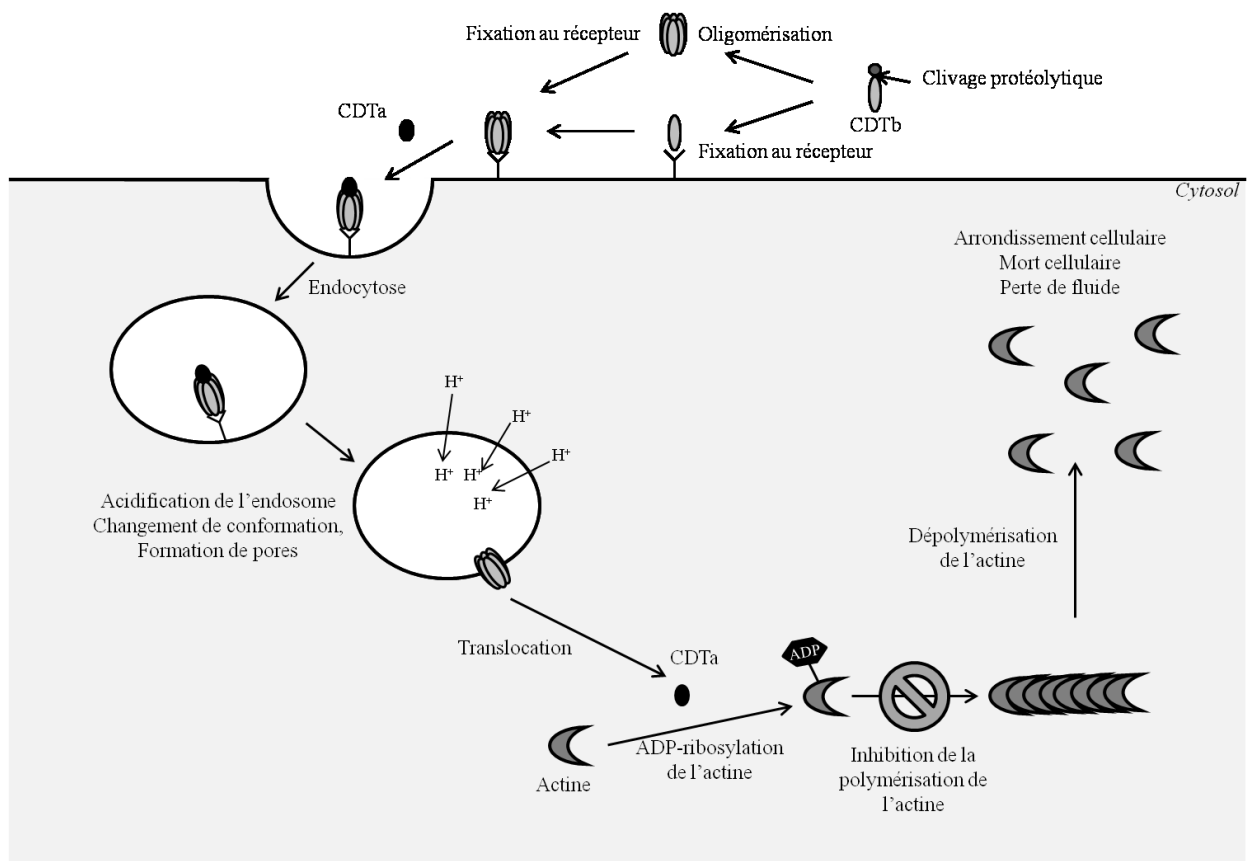


Figure 1.5 Mode d'action de la toxine binaire (adapté de [162]).

1.2.3 Les facteurs de risques

De nombreux facteurs de risques ont été identifiés dont les 3 principaux sont l'hospitalisation du patient, l'usage d'antibiotiques et l'âge du patient [172].

Les séjours en milieu hospitalier engendrent des risques dans le cadre du développement des infections à *C. difficile*. En effet, les milieux hospitaliers ne sont pas juste des réservoirs pour l'infection mais surtout un vecteur de transmission [173]. En effet, le taux d'acquisition des ICDs est très important en milieu hospitalier [174]. Les acquisitions sont dues à l'exposition aux spores de *C. difficile* qui peuvent être véhiculées par des patients infectés, le personnel soignant ou les surfaces de l'institution de santé [175].

L'exposition aux antibiotiques est un risque majeur dans le développement d'infections à *C. difficile*. Le microbiote intestinal a pour fonction de protéger la muqueuse intestinale contre la colonisation et l'infection par des agents pathogènes comme *C. difficile*. L'usage d'antibiotiques entraîne une perturbation du microbiote qui peut permettre une éclosion de *C. difficile* [176]. Même les antibiotiques utilisés pour soigner les infections à *C. difficile*, la vancomycine et le métronidazole, sont ironiquement responsables de la perturbation du microbiote et de la perte de la résistance à la colonisation [177]. Dans ces circonstances, il est possible qu'il y ait une germination de spores de *C. difficile* et une croissance des cellules végétatives dans le TGI causant ainsi une réémergence de la population de *C. difficile* menant à une récurrence [178]. Certains antibiotiques comme la clindamycine, les céphalosporines et les fluoroquinolones, sont problématiques car *C. difficile* y est résistant [179]. D'autres risques sont inhérents à l'usage d'antibiotiques comme par exemple les doses utilisées, l'usage multiple d'antibiotiques et l'augmentation du temps d'utilisation [180].

L'âge avancé des patients, ≥ 65 ans, est aussi un facteur de risque important dans le cadre d'infections à *C. difficile*. Les raisons particulières sont une diminution de la réponse immunitaire, une augmentation des comorbidités et une augmentation des expositions aux antibactériens ainsi que l'environnement des soins de santé [181].

D'autres facteurs de risques ont été identifiés comme le tabagisme [182], l'usage de tubes nasogastriques [183] ou encore l'usage d'agents antiacides [184].

1.2.4 La gestion et le traitement des infections à *C. difficile*

Une fois que le patient est identifié comme atteint d'une ICD, plusieurs mesures générales doivent être respectées. En effet, le patient doit être isolé dans une chambre privative en suivant des précautions complémentaires de type contact spécifiques de *C. difficile*. Elles comprennent le port de gants et d'une sur-blouse à manches longues, l'utilisation de matériels à usage unique, un bio-nettoyage de l'environnement (agent désinfectant sporicide) et un lavage des mains après le retrait des gants. Sur ce dernier point, il faut préciser que les solutions hydroalcooliques ne sont pas efficaces contre les spores de *C. difficile*. Il faut donc effectuer un lavage au savon pour éliminer les spores puis compléter avec une solution hydroalcoolique pour éliminer les cellules végétatives résiduelles [175, 185]. Les autres mesures consistent en la réhydratation du patient, l'arrêt du ou des antibiotiques inducteurs de l'infection et l'arrêt des ralentisseurs de la motilité intestinale [175, 185]. Il a été montré que dans le cas d'infection bénigne, l'arrêt de la prise de l'antibiotique inducteur permet, dans 15 à 20 % des cas, une amélioration clinique et alors aucun traitement spécifique n'est nécessaire [186].

Les traitements sont en fonction de la gravité de l'infection, soit peu ou modérément sévère, sévère, très sévère et compliquée ou récidive. Les critères et les traitements correspondants sont résumés dans le tableau 1.1. En accord avec les lignes directrices de l'IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) et de SHEA (*Society of Healthcare and Epidemiology of America*), les antibiotiques à utiliser dans le cadre d'infections à *C. difficile* sont la vancomycine, le métronidazole [175] et le fidaxomycin, qui a été récemment approuvé en 2011 par la FDA (*Food and Drug Administration*) [6].

Le métronidazole est actuellement recommandé pour le traitement de diarrhées simples et de colites peu sévères en absence de contre-indication [175]. Aussi efficace que la vancomycine [187], il est privilégié pour son faible coût et pour éviter l'émergence d'entérocoques résistants à la vancomycine [175]. Il engendre différents effets secondaires comme des nausées, des vomissements, un goût métallique, des éruptions ou des rashes cutanés [187].

La vancomycine est recommandée pour le traitement des ICDs sévères et en combinaison avec le métronidazole dans le cas de ICDs compliquées [175]. La vancomycine est préférée

au métronidazole dans le cas des ICDs sévères en raison de son meilleur taux de guérison chez ces patients (97 % versus 76 %) [188]. La vancomycine étant peu absorbée n'entraîne pas d'effets secondaires systémiques, mais peut engendrer l'apparition d'entérocoques résistants à la vancomycine et a un coût supérieur au métronidazole [188].

La fidaxomicine est caractérisée par un étroit spectre d'action ciblé sur les bactéries à Gram positif. Elle entraîne moins d'effets délétères sur le microbiote intestinal que la vancomycine et le métronidazole [6]. Par contre, l'usage de la fidaxomicine est limité à cause de son prix élevé.

Tableau 1.3 : Guide pour le traitement des infections à *C. difficile*.

Degré de sévérité	Faible/modéré	Sévère	Sévère/compliqué
Critère	Leucocytes \leq 15000/mm ³ et Créatinine < 1,5 fois la valeur de base	Leucocytes \geq 15000/mm ³ ou Créatinine \geq 1,5 fois la valeur de base	Hypotension, choc, iléus ou mégacôlon
Traitement	Métronidazole 500 mg/ 3 fois par jour 10-14 jours	Vancomycine 125 mg/4 fois par jour 10-14 jours	Vancomycine 500 mg/4 fois par jour + Métronidazole 500 mg toutes les 8 h en intraveineuse

1.2.5 La récurrence et la résistance

Malgré l'efficacité de ces antibiotiques, des échecs cliniques et des rechutes sont observés. Les récurrences sont définies par une réapparition de l'infection dans les deux mois qui suivent le début de l'épisode initial [189]. Les taux d'échecs pour les infections à *C. difficile* sont de 14,2 %, 22,4 % et 11,8 % respectivement pour le traitement avec la vancomycine, le métronidazole et la fidaxomicine. Les taux de récurrence d'infections à *C. difficile* sont de 24 %, 27,1 % et 15,45 %, respectivement, pour la vancomycine, le métronidazole et la fidaxomicine [190, 191].

De plus, une équipe espagnole a démontré que 3 % des souches de *C. difficile* isolées dans leur hôpital avaient une sensibilité réduite à la vancomycine et que 6,5 % des souches étaient

résistantes au métronidazole [192, 193]. Ce constat de réduction de sensibilité ou de résistance soulève des questions sur les limites des antibiotiques utilisés, à savoir si les concentrations retrouvées au niveau fécal seront suffisantes pour avoir l'action désirée ou si l'antibiotique sera tout simplement efficace pour traiter l'infection.

1.2.6 Les traitements alternatifs des infections à *C. difficile*

Plusieurs traitements alternatifs ont été proposés pour le traitement des ICDs. La riflaximicine est un antibiotique non absorbable à large spectre, et actif *in vitro* sur les souches de *C. difficile*. Néanmoins, de hauts niveaux de résistance semblent apparaître assez rapidement au cours du traitement et elle cause des altérations significatives du microbiote intestinal [194]. La riflaximicine n'est actuellement pas recommandée en monothérapie mais peut être utilisée comme traitement de consolidation après un traitement à la vancomycine dans les cas de patients souffrant de récives multiples ou ne répondant pas aux traitements conventionnels [194].

La nitazoxamide est habituellement utilisée pour traiter les infections parasitaires digestives mais est aussi active contre *C. difficile*. Elle a montré une efficacité équivalente au métronidazole et à la vancomycine pour le traitement des ICDs [195, 196].

Les perfusions intraveineuses d'immunoglobulines peuvent être effectuées pour le traitement d'ICDs mais les résultats semblent très variables [197, 198]. Le mode d'action est dû à la présence d'anticorps contre la TcdA et la TcdB de *C. difficile* [199].

La transplantation de microbiote fécal (TMF) consiste à administrer un filtrat de suspension de selle d'un donneur sain à un patient malade afin de rééquilibrer la flore intestinale altérée du patient. Le premier cas de TMF a été publié en 1958. Les auteurs ont signalé le succès du traitement de 4 patients atteints de graves CPM en utilisant des lavements fécaux [200]. Depuis quelques années, ce traitement est utilisé pour des patients souffrant de multiples récives d'ICD. En effet, ces patients ont démontré une perte de leur diversité du microbiote intestinal [176]. Il existe 3 voies pour effectuer la transplantation, soit par un tube nasogastrique, par coloscopie ou par lavements. La dernière méthode est la moins coûteuse et la moins susceptible de blesser le patient [7]. Par contre, la préparation du spécimen est

particulièrement dispendieuse car une batterie de tests doit être effectuée pour s'assurer que le spécimen soit dépourvu de microorganismes résistants aux antibiotiques et/ou d'agents pathogènes (VIH, syphilis, hépatites (A, B, C)) [201]. Sur 317 patients traités par TMF, le taux de réussite fut de 92 % sans que l'on observe d'épisodes de récurrence [202]. Une autre étude, portant sur le suivi pendant 24 semaines de 10 patients ayant reçu une TMF, a montré que les modifications du microbiote restaient stables dans le temps et que le microbiote des patients était essentiellement composé de celui du donneur [203].

Enfin, l'usage de probiotiques est une voie qui commence à être étudiée et explorée dans le cas de traitement d'ICD. *Saccharomyces boulardii* et *Lactobacillus rhammosus* GG sont les deux microorganismes probiotiques les plus caractérisés pour une utilisation dans le cas d'ICD [204-206]. Une méta-analyse (Cochrane review) concluait à une insuffisance de preuves pour recommander l'usage de probiotiques en même temps qu'un traitement antibiotique pour traiter les ICDs [8]. En 2010, une étude clinique contrôlée *versus* placebo a été effectuée pour évaluer l'efficacité d'une combinaison de deux souches probiotiques (*L. acidophilus* LC1285 et *L. casei* LBC80R) comme prophylactiques dans le cas de diarrhées associées aux antibiotiques (DAA) et de diarrhées associées à *C. difficile* (DACD). Ils ont montré une diminution des incidences de DAA et DACD de 44,1 % et 23,8 % respectivement pour le groupe placebo et 15,5 % et 1,2 % respectivement pour le groupe recevant la combinaison de probiotiques [207].

1.3 Les probiotiques

Le concept original des probiotiques est née en 1907, suite aux observations d'Élie Metchnikoff sur la longévité et la bonne santé de paysans bulgares. En effet, ces derniers consommaient une grande quantité de lait fermenté, la forme ancestrale du yogourt. En faisant des recherches sur leur alimentation, Metchnikoff découvrit une bactérie unique dans le lait fermenté bulgare qui produisait de l'acide lactique [208].

Le terme probiotique est un dérivé du grec qui signifie "pour la vie". Sa définition a évolué en fonction des connaissances scientifiques croissantes et d'une meilleure compréhension de la relation entre la santé intestinale et bien-être général. Voici l'évolution de la définition de probiotique au cours du temps :

- Substances produites par des microorganismes qui favorisent la croissance d'autres microorganismes [209].
- Organisme ou substance ayant des effets bénéfiques pour l'animal en influant la microflore intestinale [210].
- Supplément alimentaire de microorganismes vivants avec des effets bénéfiques sur l'animal hôte en améliorant son équilibre intestinal microbien [211].
- Une ou un mélange de culture de microorganismes vivants, qui appliqué à l'animal ou l'Homme, affectant favorablement l'hôte par l'amélioration des propriétés de la microflore indigène [212].
- Produit fonctionnel s'il démontre de façon satisfaisante qu'il a un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions du corps, mise à part l'effet nutritionnel, par une manière pertinente soit par un meilleur état de santé ou de bien-être et/ou par la réduction des risques de maladies [213].
- Adjuvant microbien diététique qui a des effets bénéfiques sur la physiologie de l'hôte aussi bien sur la modulation mucoale et du système immunitaire que sur l'amélioration nutritionnelle et sur l'équilibre microbien dans le tractus intestinal [20].
- Cellules microbiennes qui transitent dans le tractus gastro-intestinal et qui, ce faisant, sont bénéfiques à la santé du consommateur [214].
- Préparation d'un produit contenant des microorganismes définis, viables et en nombre suffisant qui altèrent la microflore (par implantation ou colonisation) dans une partie de l'hôte et, de ce fait, exerçant des effets bénéfiques sur la santé de l'Hôte [215].
- Microorganismes vivants qui lorsque administrés à des doses adéquates exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte [9].

1.3.1 Le mode de sélection

Un groupe de travail de la FAO/WHO a déterminé les lignes directrices pour l'évaluation de probiotiques [216]. Les étapes nécessaires pour pouvoir prétendre au titre de probiotique sont indiquées à la figure 1.6.

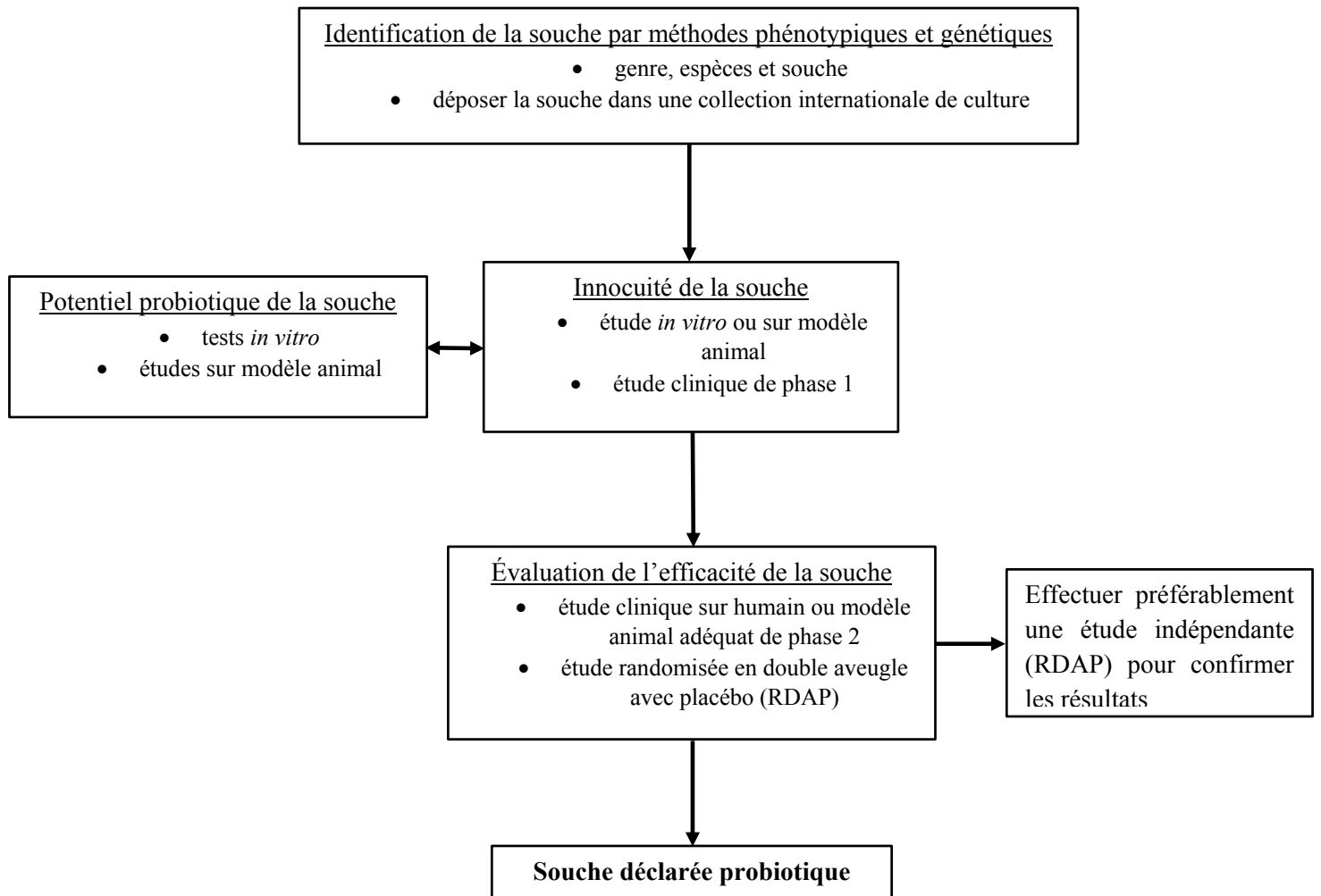


Figure 1.6 Critères d'évaluation d'un probiotique (adapté de FAO/WHO [216]).

1.3.1.1 L'identification de la souche

Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche probiotique car l'effet probiotique est spécifique à la souche. Il est donc recommandé d'effectuer une combinaison de tests phénotypiques et génétiques pour une identification précise. Les méthodes proposées sont l'hybridation ADN-ADN, le séquençage de l'ADN codant l'ARN ribosomal 16S, l'utilisation de gel électrophorétique à champs pulsés, l'amplification aléatoire d'ADN polymorphique ainsi que le profil de fermentation des sucres et le profil plasmidique. De

plus, une fois la souche identifiée, il est recommandé de la déposer dans une collection internationale de culture [216].

1.3.1.2 L'évaluation du potentiel probiotique par des essais *in vitro*

La souche doit être capable de résister à l'acidité gastrique, aux sels biliaires, d'adhérer au mucus et/ou aux cellules épithéliales, d'avoir une activité antimicrobienne contre des bactéries potentiellement pathogènes, avoir l'habileté de diminuer l'adhésion des pathogènes aux surfaces, d'avoir une activité hydrolytique des sels biliaires et finalement pour les probiotiques qui auront un usage vaginal, d'être résistants aux spermicides. Par contre, pour un usage chez l'humain, les tests *in vitro* ne seront pas suffisants et nécessiteront une validation *in vivo* [216].

1.3.1.3 L'évaluation de l'innocuité de la souche

Afin de s'assurer du côté sécuritaire de la souche, il est recommandé d'évaluer sa résistance aux antibiotiques, certaines de ses activités métaboliques comme la déconjugaison des sels biliaires ou la production de D-lactate. Il est aussi recommandé de suivre les effets secondaires pendant des essais cliniques et chez les consommateurs (suite à une mise en marché). Dans le cas de souches ayant une affiliation à une espèce reconnue comme étant productrice de toxines, il est nécessaire de vérifier la production de toxine. Dans le cas de souches ayant une affiliation à une espèce reconnue comme hémolytique, il est nécessaire de déterminer l'activité hémolytique de la souche [216].

1.3.1.4 L'évaluation de l'efficacité du probiotique par essai clinique sur animaux ou humains

Il est recommandé d'effectuer une étude clinique de phase 2 pour évaluer l'efficacité du probiotique. Il s'agit généralement d'études d'efficacité comparées à un placebo et randomisées en double aveugle. Cette procédure doit amener une preuve de l'amélioration biologique significative de la situation avec l'usage du probiotique par rapport au placebo, soit au niveau des symptômes, du bien-être, de la réduction du risque de maladie, d'un retard dans la récurrence de la maladie ou d'une récupération plus rapide. Dans le cas de probiotiques pris via l'alimentation, une étude de phase 2 est suffisante. Par contre dans le cas d'un usage curatif du probiotique, il est nécessaire d'effectuer une étude clinique de phase 3 en

comparaison avec un traitement standard. Il est aussi conseillé de faire une vérification par un groupe indépendant pour valider les résultats obtenus [216].

1.3.1.5 La réglementation en terme d'allégations santé et d'étiquetage

Le comité de FAO/WHO recommande que certaines informations soient décrites sur l'étiquetage :

- Une bonne description de la souche par la détermination du genre et de l'espèce;
- La quantité minimale viable de chaque souche à la fin de la durée de vie du produit;
- La portion recommandée pour obtenir les effets bénéfiques sur la santé;
- L'allégation santé;
- Les conditions de stockage;
- Les coordonnées de l'entreprise pour obtenir des informations complémentaires.

Les allégations santé pour les probiotiques sont en fonction de l'effet du probiotique lui-même. Plusieurs allégations existent :

- Stimulation du système immunitaire [10, 217];
- Prévention des diarrhées dues aux virus ou aux prises d'antibiotiques [11, 12, 218, 219];
- Réduction des symptômes d'allergies chez l'enfant [13];
- Protection et lutte contre les infections et pathologies intestinales [14, 220].

1.3.2 Les mécanismes d'action des probiotiques

De nombreux mécanismes d'action (Figure 1.7) ont été proposés pour expliquer les effets bénéfiques des probiotiques. La plupart des résultats sont issus d'expériences *in vitro*, et doivent être confirmés par des expériences *in vivo*. Les effets des probiotiques peuvent être divisés en deux mode d'action. Les probiotiques ont la capacité de moduler les défenses de l'hôte tant au niveau du système immunitaire acquis qu'inné (effets sur la fonction barrière de l'épithélium, sur l'inflammation, sur le système immunitaire, sur la production de peptides antimicrobiens). Les probiotiques peuvent avoir une action directe sur les microorganismes

commensaux ou pathogènes (compétition pour les nutriments, exclusion compétitive, effet antitoxine et production de composés antimicrobiens).

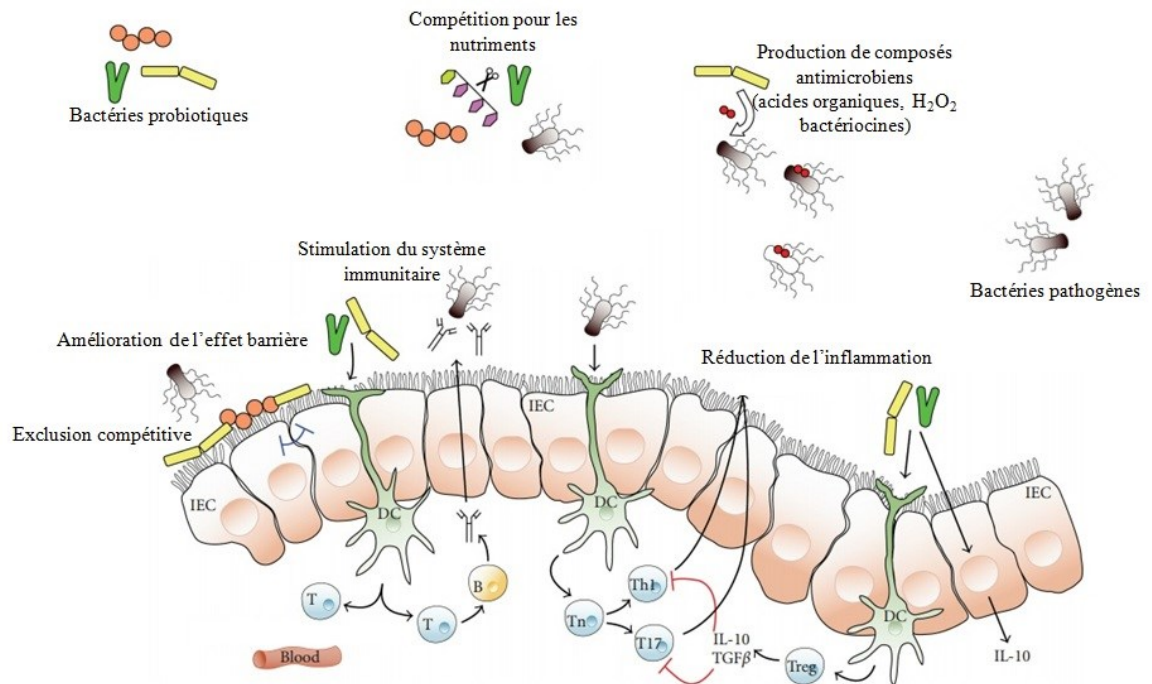


Figure 1.7 Principaux mécanismes d'action des microorganismes probiotiques au niveau du tractus gastro-intestinal (adapté de O'Toole and Cooney [15]).

1.3.2.1 La modulation des défenses de l'hôte

1.3.2.1.1 L'effet sur la fonction barrière de l'épithélium

Certaines bactéries probiotiques ont montré une capacité à préserver la fonction barrière de l'épithélium ainsi que prévenir et réparer les dommages de la muqueuse provoqués par des pathogènes ou par des cytokines pro-inflammatoires. Ces effets protecteurs se font via différents mécanismes tels que l'induction de la sécrétion de mucine, l'entretien et le renforcement du cytosquelette, la phosphorylation des protéines des jonctions serrées et l'augmentation de la résistance trans-épithéliale [221-224].

1.3.2.1.2 L'effet sur l'inflammation

Il a été montré que certaines bactéries probiotiques avaient une activité anti-inflammatoire par l'altération de la production de cytokine en modulant les signaux de transduction cellulaire. Des composants solubles issus du mélange de probiotiques VSL#3, composé de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Bifidobacteria longum*, *B. infantis* et *B. breve*, ont montré une capacité à inhiber la dégradation de IκB, un inhibiteur du facteur nucléaire (nuclear factor, NF) (NF)-κB (facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et inflammatoire à un signal de stress), en inhibant la fonction du protéasome épithélial [224]. Par ailleurs, une étude a démontré que *L. reuteri* était capable d'inhiber la translocation de NF-κB vers le noyau et de prévenir la dégradation de IκB, mais cette aptitude est conditionnelle à l'attachement de *L. reuteri* à la cellule [225]. Une autre étude a observé l'effet anti-inflammatoire de la souche d'*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) via la sécrétion d'un facteur. Celui-ci a pour effet d'inhiber la transactivation de l'IL-8 pro-inflammatoire induite par le facteur de nécrose tumorale (TNF)α suite à un mécanisme indépendant de l'inhibition de NF-κB [226].

1.3.2.1.3 L'effet sur le système immunitaire

Certaines bactéries probiotiques ont, comme mécanisme de protection contre les infections intestinales, la capacité de stimuler le système immunitaire aussi bien inné qu'acquis [227-229]. L'effet des probiotiques sur l'immunité innée est effectué sur le renforcement des activités des macrophages et des cellules tueuses naturelles. En effet, la consommation de *L. johnsonii* La1 et *B. lactis* Bb12 a entraîné une augmentation de l'activité phagocytaire dans le sang périphérique des sujets ayant consommés les souches probiotiques. Cet effet a perduré dans le temps [229]. Pour ce qui est de l'impact sur l'immunité acquise, des études ont montré que certaines souches probiotiques engendraient une augmentation de la prolifération des cellules sécrétant des immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) [227, 230] ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IgA spécifique et totale dans le sérum et la lumière intestinale [231].

1.3.2.1.4 L'effet sur la production de peptides antimicrobiens

Les défensines sont des PAMs produits par des cellules du TGI. Il a été montré que les mélanges probiotiques VSL#3 et Symbioflor 2 (mélange de souches probiotiques viables de *E. coli*) augmentaient l'expression et/ou la sécrétion de β -défensine-2 par les cellules Caco-2 [232, 233]. De plus, une étude sur des humains en bonne santé ayant reçu du Symbioflor, a montré une augmentation du niveau de protéine hBD-2 dans les échantillons fécaux tandis que le niveau de hBD-2 n'avait pas changé pour le groupe placebo [232].

1.3.2.2 L'action directe sur les microorganismes commensaux ou pathogènes

1.3.2.2.1 La compétition pour les nutriments

Il a été montré que la consommation de cultures probiotiques pouvait moduler les propriétés métaboliques des microorganismes indigènes due à la compétition pour le substrat nutritionnel, et particulièrement les glucides. Une étude, utilisant des puces ADN de transcription, a montré que l'introduction d'un probiotique dans l'intestin d'une souris changeait le métabolisme du microbiote indigène. En effet, dans le cas de souris axéniques qui avaient été inoculées avec une souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* et qui avaient été nourries avec deux souches probiotiques séparément (*Bifidobacterium animalis* et *Lactobacillus casei*), les deux expériences avaient entraîné des modifications de l'expression du génome de *B. thetaiotaomicron* notamment celles associées à la capacité de métaboliser les hydrates de carbones [234].

1.3.2.2.2 L'exclusion compétitive

La capacité des probiotiques à adhérer aux cellules épithéliales entraîne le blocage de l'adhérence des organismes pathogènes. Cet effet anti-adhésion peut être le résultat de la compétition entre le probiotique et l'agent pathogène pour le récepteur membranaire comme il a été démontré avec la souche de *L. rhamnosus* GG qui est capable de bloquer l'adhésion de souches de *E. coli* et de *Salmonella* [235]. Un autre mode pour limiter l'adhésion des pathogènes par les probiotiques est la capacité de ces dernières à stimuler la production de mucine. En effet, les souches *L. plantarum* 299V et *L. rhamnosus* GG ont montré, *in vitro*, leur capacité à inhiber l'adhésion d'*E. coli* entéropathogène sur des cellules épithéliales HT-29 par l'induction de l'expression des gènes de la mucine intestinale [221].

1.3.2.2.3 L'effet antitoxine

Certains probiotiques protègent l'hôte de l'action de toxine. Cette protection peut être le résultat de l'inhibition de l'expression de la toxine, comme il a été montré par les souches de *B. breve* Yakult et de *B. pseudocatenulatum* DSM20439 qui ont inhibé l'expression de la toxine Shiga d'*E. coli* O157:H7 [236]. Il a aussi été démontré que *Saccharomyces boulardii* sécrétait une protéase capable de détruire la TcdA de *C. difficile* [237].

1.3.2.2.4 La production de composés antimicrobiens

Certaines souches probiotiques ont un pouvoir inhibiteur contre des souches pathogènes grâce à leur capacité de produire des molécules antimicrobiennes telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou les bactériocines [238].

1.3.2.2.4.1 Les acides organiques

De nombreuses souches probiotiques ont la capacité de produire de l'acide lactique et de l'acide acétique. Cette production, en condition intestinale, entraîne une diminution du pH de la lumière intestinale et a pour effet de limiter la croissance de pathogènes [239]. Il a été montré que l'action antimicrobienne sur *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ainsi que l'inhibition de sa capacité à envahir les cellules Caco-2/TC7 étaient dues à la production d'acide lactique par les souches *L. acidophilus* IBB 801, *L. amylovorus* DCE 471, *L. casei* Shirota et *L. rhamnosus* GG [240]. Il a été montré que les souches de *B. breve* Yakult et de *B. pseudocatenulatum* DSM20439 ont inhibé l'expression de toxine Shiga d'*E. coli* O157:H7 par leur production d'acide acétique [236].

1.3.2.2.4.2 Le peroxyde d'hydrogène

Certaines souches de *L. johnsonii* et *L. gasseri* sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) lorsqu'elles sont cultivées en présence d'oxygène [241]. Il a été montré que le surnageant de la souche *L. johnsonii* NCC533 contenant du H₂O₂ était capable d'inhiber *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 *in vitro* [241].

1.3.2.2.4.3 Les bactériocines

Certaines souches probiotiques ont la capacité de produire des bactériocines. Les bactériocines sont des composés protéiques antimicrobiens qui inhibent des souches

taxonomiquement proches de la souche productrice [242]. Il est suggéré que les bactériocines contribuent à la fonction probiotique en utilisant différentes voies. En effet, les bactériocines peuvent fonctionner en tant que peptides de colonisation, facilitant ainsi l'introduction et/ou la dominance de la souche productrice dans une niche déjà occupée [243], en tant que peptide antimicrobien en inhibant directement les souches compétitrices ou pathogènes [244] ou en tant que peptides de signalisation en modulant la communauté microbienne et en stimulant le système immunitaire de l'hôte [244, 245].

1.4 Les bactériocines

Les bactériocines ont été initialement définies comme étant des composés protéiques ayant une activité bactériostatique dirigée contre une espèce en général taxonomiquement proche de la souche productrice [246]. Cette définition a évolué au cours du temps, en même temps que l'augmentation croissante de la découverte et de la caractérisation de nouvelles bactériocines. Une nouvelle définition des bactériocines est proposée comme étant un PAM modifié ou non-modifié produit par une bactérie qui est protégée par un système d'immunité dédié [247]. Les bactériocines connues sont classées selon leurs souches productrices qu'elles soient issues de bactéries à Gram positif ou de bactéries à Gram négatif. Un intérêt croissant est porté aux bactériocines issues de bactéries à Gram positif et plus particulièrement produite par des bactéries lactiques (BLs) en raison du statut GRAS (generally recognized as safe) des souches productrices. Cette situation permettrait potentiellement une utilisation dans différents domaines comme pour un usage dans la préservation et la sécurité alimentaire, dans le domaine vétérinaire et en médecine humaine [16]. Dans cette revue de littérature, nous nous intéresserons aux bactériocines produites par les bactéries à Gram positif, en ce qui concerne les bactériocines produites par les bactéries à Gram négatif, elles sont très bien décrites dans ces revues [248-251]. Il est aussi à noter que récemment, un ensemble de scientifiques spécialisés dans les peptides antimicrobiens de toute nature se sont consultés pour établir une vue d'ensemble et des recommandations pour proposer une nomenclature universelle pour les peptides naturels (<10 kDa) issus de synthèse ribosomale et qui ont subi une modification post-traductionnelle [252]. Dans la classification proposée par ce groupe, la classe des lanthipeptides apparaît et englobe tout peptide comportant un résidu modifié comme la lanthionine et la β -méthyllanthionine issu d'une

modification post-traductionnelle. Cette nouvelle classe dans la classification globale des peptides antimicrobiens correspond à la classe Ia et Ib de la classification des bactériocines produites par des bactéries à Gram positif [247]. En ce qui concerne les bactériocines de la classe Ic, elle se retrouve dans la classe des sactipeptides, classe de peptides de synthèse ribosomale qui ont subi une modification post-traductionnelle pour créer des liaisons intramoléculaires entre le soufre de la cystéine et le carbone- α d'un autre acide aminé. Enfin la classe IIc se retrouve dans la classe de peptides bactériens cycliques « en tête à queue » qui regroupe les peptides ayant une liaison peptidique entre les extrémités C- et N-terminales donnant une forme cyclique au peptide. [252].

1.4.1 La classification des bactériocines produites par des bactéries à Gram positif

Étant donné l'intérêt pour les bactériocines produites par les BLs, la classification s'est faite en fonction des propriétés biochimiques, génétiques et sur les profils de bioactivités de ces dernières. La première classification fut proposée par Klaenhammer [253] et comprenait 4 groupes. Les bactériocines de classe I, également appelées les lantibiotiques, regroupent les peptides thermostables de faibles poids moléculaire (<5 kDa) et qui sont caractérisés par la présence de résidus inhabituels, tels que la lanthionine ou la β -méthyllanthionine, produits par une modification post-traductionnelle [254]. Les bactériocines de classe II sont de petits peptides thermostables non-modifiés (<10 kDa). Les bactériocines de la classe III sont des grosses protéines thermolabiles (>30 kDa) et les bactériocines de la classe IV incluent des peptides cycliques dont les extrémités N- et C-terminales sont liées de façon covalente [253]. Cette classification a été modifiée au cours du temps pour arriver à une nouvelle classification proposée par Rea et ses collaborateurs (2011) basée sur la présence ou l'absence de résidus modifiés post-traductionnellement [247].

1.4.1.1 La classe I : les bactériocines avec modification post-traductionnelle

Cette classe I est composée de 3 sous-classes : les lantibiotiques (classe Ia), les labyrinthopeptides (classe Ib) et les sactibiotiques (classe Ic).

1.4.1.1.1 La classe Ia (les lantibiotiques)

Les lantibiotiques sont des peptides thermostables de faibles poids moléculaire (<5 kDa, long de 19-28 acides aminés) qui subissent des modifications post-traductionnelles et qui contiennent des résidus modifiés comme la lanthionine et la β -méthyllanthionine ainsi que d'autres résidus inhabituels tels que la déhydroalanine et la déhydrobutyrine. Cette classe regroupe des bactériocines des peptides simples (nisine) ou à double composante (lacticine 3147) [255].

1.4.1.1.2 La classe Ib (les labyrinthopeptides)

Les labyrinthopeptides ont été identifiées récemment et nommées en raison de leur structure "labyrinthique". Il s'agit d'une classe de peptides ayant subi une modification post-traductionnelle qui se distinguent par la présence d'un résidu inhabituel, la labionine. Cette classe regroupe les labyrinthopeptides A1 et A2 produites par *Actinomadura namibiensis* DSM 6313 [256].

1.4.1.1.3 La classe Ic (les sactibiotiques)

Cette classe est caractérisée par des peptides ayant subi une modification post-traductionnelle et qui possèdent une liaison entre un atome de soufre de la cystéine et un carbone- α [257]. Cette classe regroupe la subtilosine A produite par *Bacillus subtilis*, un peptide cyclique, et la thuricine CD, une bactériocine à double composante (Trn α et Trn β) produite par *Bacillus thuringiensis* 6431 [257, 258].

1.4.1.2 La classe II : les bactériocines sans modification post-traductionnelle

La classe II constitue un groupe hétérogène de peptides thermostables de poids moléculaire inférieur à 10 kDa et est composée de 4 sous-groupes : les bactériocines ressemblant à la pédiocine (la classe IIa), les bactériocines à double composante (la classe IIb), les bactériocines cycliques (la classe IIc) et les bactériocines linéaires ne ressemblant pas à la pédiocine (la classe IId).

1.4.1.2.1 La classe IIa (les bactériocines ressemblant à la pédiocine)

Les bactériocines de cette classe ont toutes la capacité d'inhiber *Listeria monocytogenes* [259]. La taille de ces bactériocines est comprise entre 55 acides aminés pour l'acidocine A et 27 acides aminés pour la sakacine G [260, 261]. De plus, elles ont toutes en commun une région conservée, la région N-terminale, et possède un motif commun Y-G-N-G-V-X₁-C-X₂-K/N-X₃-X₄-C (X étant n'importe quel acide animé) [259]. Dans la partie N-terminale, deux cystéines sont liées par un pont disulfure [262]. La partie C-terminale est quant à elle variable [259]. À ce jour, 34 bactériocines de la classe IIa ont été recensées [259, 263].

1.4.1.2.2 La classe IIb (les bactériocines à deux peptides)

Les bactériocines de classe IIb ont des tailles allant de moins de 40 acides aminés (plantaricine S [264]) à plus de 50 acides aminés (lactacine F [265]). Elles sont caractérisées par la présence de deux peptides dont l'interaction est nécessaire à l'activité antimicrobienne, chacun des peptides séparément n'ayant pas ou peu d'activité [266]. Aujourd'hui, 16 bactériocines double peptides sont connues [259].

1.4.1.2.3 La classe IIc (les bactériocines circulaires)

Les bactériocines de la classe IIc sont des peptides cycliques généralement stables à la chaleur, actifs contre *Listeria* et résistants à la protéolyse [267]. Huit bactériocines cycliques sont identifiées dont six produites par une BL et deux par des bactéries non lactiques [247].

1.4.1.2.4 La classe IId (les bactériocines linéaires ne ressemblant pas à la pédiocine)

Cette classe de bactériocines englobe l'ensemble des bactériocines qui ne rentrent pas dans les définitions des autres classes. Elle sont au nombre de 31 [259].

1.4.1.3 Les bactériolysines

Les bactériolysines sont des protéines antimicrobiennes thermolabiles de poids moléculaire supérieur à 30 kDa [247].

1.4.2 Le mode d'action des bactériocines

1.4.2.1 Le mode d'action de la classe I

Deux mécanismes d'action ont été proposés pour les bactériocines de la classe I telles que la nisine, à savoir la formation de pores et le blocage de la synthèse du peptidoglycane. La formation de pores fait suite à la liaison entre ces bactériocines et les lipides II présent dans la membrane bactérienne. Cette liaison entraîne une dépolarisation des membranes s'accompagnant d'une formation de pores dans la double couche phospholipidique. Les pores formés entraînent un épuisement de la force proton motrice des cellules cibles par la création d'un afflux non spécifique de molécules (acides aminés, cations), une perte de potentiel membranaire, du gradient de pH et une fuite d'ATP. Il en résulte une mort cellulaire [253, 268].

Par ailleurs, le blocage de la synthèse de peptidoglycane par les bactériocines de la classe I est due à la fixation de la bactériocine avec le lipide II qui se retrouve sur la surface externe de la membrane cytoplasmique et qui est un précurseur de la voie de synthèse du peptidoglycane [269].

1.4.2.2 Le mode d'action de la classe II

Les bactériocines de la classe II forment également des pores qui induisent une perméabilité membranaire et qui conduisent à la dissipation de la force proton motrice et l'appauvrissement en ATP intracellulaire [270, 271]. La formation du pore se fait par la liaison de la partie N-terminale de la bactériocine sur la membrane de la cellule cible par des interactions électrostatiques [272]. La partie C-terminale de la bactériocine pénètre obliquement dans la membrane ce qui crée le pore [272].

1.4.2.3 Le mode d'action des bactériolysines

Le mécanisme d'action des bactériolysines est différent des bactériocines car elles induisent la lyse des cellules sensibles par hydrolyse de leur paroi cellulaire. Ces protéines ont une modularité dans leur structure. Elles possèdent dans leur partie N-terminale le domaine

catalytique qui est homologue à des endopeptidases, et dans leur partie C-terminale, probablement le domaine de reconnaissance du site cible [273].

1.4.3 La nisine

La nisine, bactériocine de classe I, est la première bactériocine à avoir obtenu le statut GRAS aux États-Unis [253]. L'utilisation de la nisine est admise dans plus de 50 pays comme additif alimentaire en Europe (E234) et est approuvée par la FDA [16]. Les souches de *Lactococcus lactis* produisent trois variants structurels de nisine. La nisine A est le prototype, la nisine Z diffère par un acide aminé (position 27, l'histidine de la nisine A est remplacé par l'asparagine) [274] et la nisine Q diffère par quatre acides aminés (position 15, l'alanine est remplacée par la valine; position 21, la méthionine par la leucine; position 27, l'histidine par l'asparagine et position 30, l'isoleucine par la valine) [275]. La nisine est un peptide cationique constitué de 34 acides aminés et possède un caractère amphiphile : hydrophobe du côté N-terminal et hydrophile du côté C-terminal [276, 277]. Elle est aussi caractérisée par la présence de trois résidus inhabituels (2 déhydroalanine (Dha) et 1 déhydrobutyrine (Dhb)) et par la présence de cinq résidus thioethers, une lanthionine et quatre β -méthyllanthionine (Figure 1.8) [253].

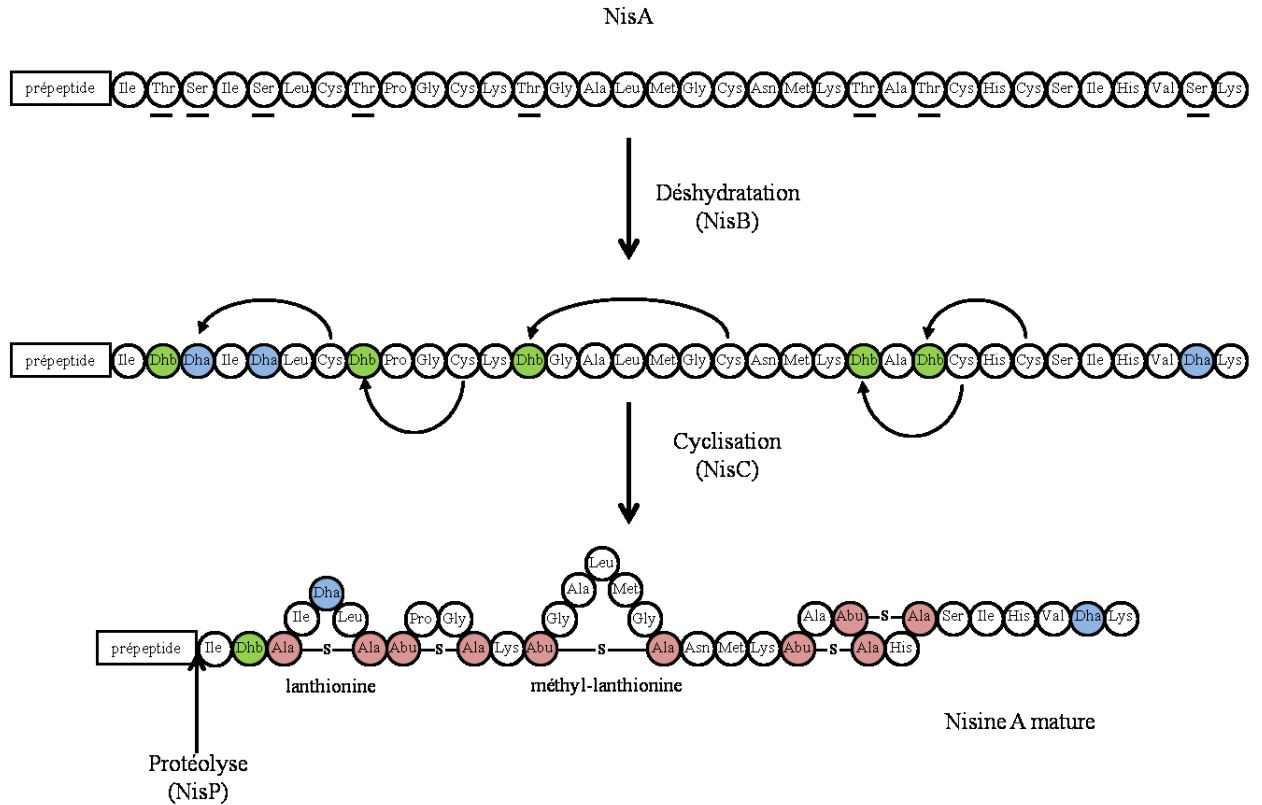


Figure 1.8 Structure de la nisine A. Les résidus déhydroalanine (Dha) et déhydrobutyrine (Dhb) sont obtenus par la déshydratation engendrée par NisB sur les sérines (Ser) et les thréonines (Thr) sélectionnées, respectivement. Cette déshydratation se fait par le biais d'une phosphorylation des sérines et des thréonines suivie d'une élimination du groupement phosphate, ce qui génère les résidus Dha et Dhb. Il s'en suit une cyclisation (5) entre une cystéine et un résidu Dha ou Dhb formant soit une lanthionine ou une méthyl-lanthionine, respectivement. La nisine mature est obtenue après le clivage protéolytique du prépeptide grâce à NisP (adapté d'Arnison *et al.*, [252]).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la nisine sont regroupés et organisés sur un transposon. Il contient les gènes nécessaires à la biosynthèse du peptide précurseur (NisA), des enzymes servant à la modification post-traductionnelle (NisBC), à la translocation (NisT), à l'enzyme libérant le peptide mature (NisP), à l'immunité (NisEFG) et à la régulation (NisKR) (Figure 1.9) [269, 278].

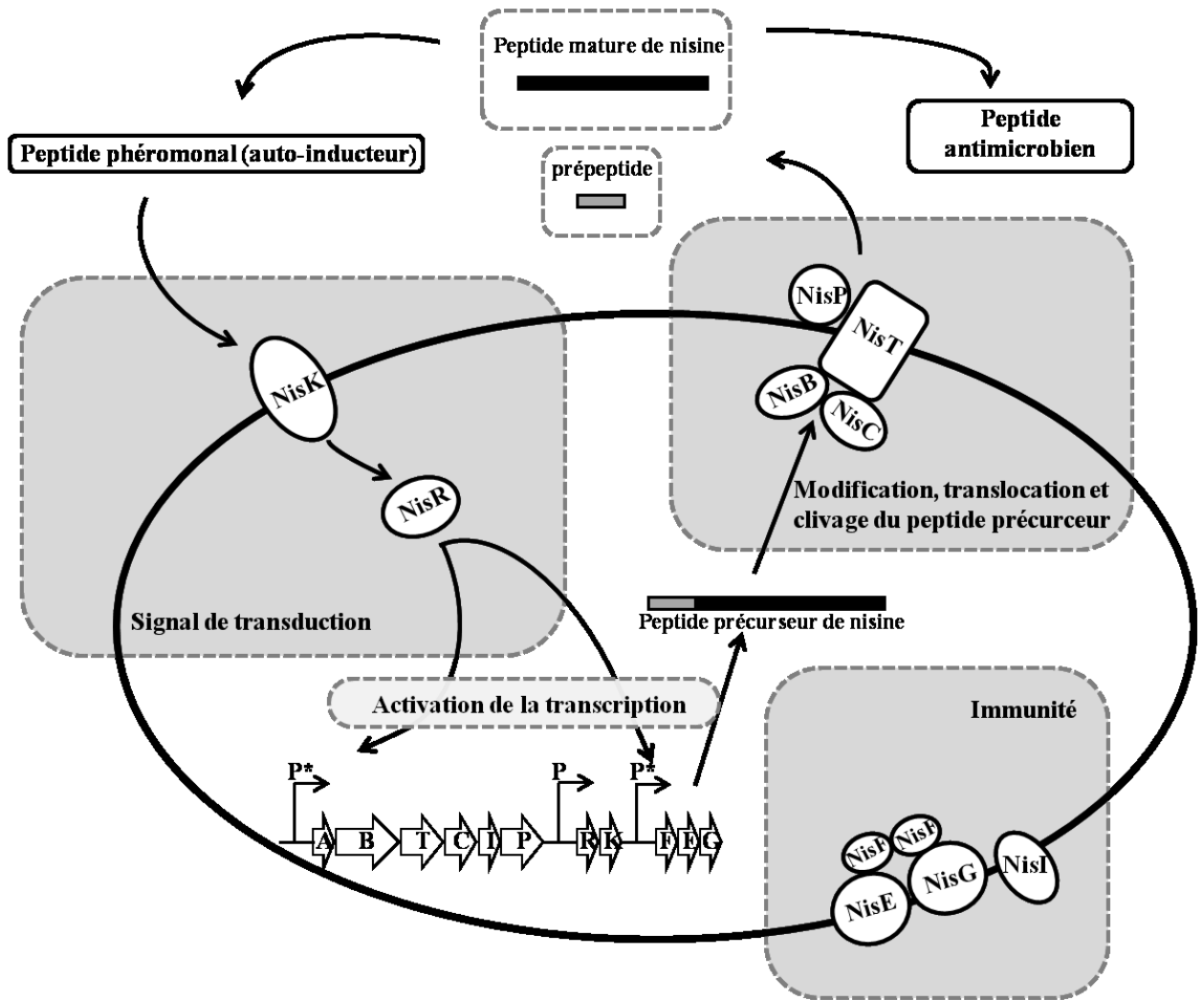


Figure 1.9 Représentation schématique de la biosynthèse et de la régulation de la nisine dans *Lactococcus lactis*. Le peptide précurseur de la nisine est synthétisé (encodé par NisA), modifié (déshydratation avec NisB, cyclisation avec NisC), puis transloqué (NisT) et finalement après une protéolyse (NisP), la nisine mature est libérée. La nisine agit comme peptide antimicrobien et aussi comme peptide phéromonal qui peut induire une activation de sa propre biosynthèse via les deux composés de régulation NisK et NisR. La cellule productrice possède une protection contre l'action de la nisine grâce au système d'immunité composé de NisI et NisEFG (adapté de Cheigh and Pyun [278]).

L'activité inhibitrice de la nisine se fait par la formation de pores et par l'inhibition de la synthèse de peptidoglycane comme il a été mentionné précédemment au point 1.4.2.1 [253, 269].

1.4.4 Les bactériocines pour lutter contre les infections nosocomiales et gastro-intestinales

Jusqu'à présent, peu d'études ont été menées pour évaluer l'effet de la bactériocine seule contre les bactéries pathogènes dans les conditions intestinales *in vitro* ou *in vivo*. L'activité inhibitrice des bactériocines contre les souches pathogènes est en effet le plus souvent observée et quantifiée dans des milieux de culture synthétiques par des tests *in vitro* [258, 279-282]. L'action *in vivo* des bactériocines est quant à elle évaluée de façon indirecte par l'usage de la souche productrice [283, 284]. Souvent, l'activité inhibitrice observée *in vitro* n'est pas retrouvée *in vivo* avec les souches productrices [285].

L'activité inhibitrice *in vivo* de la lacticine 3147, une bactériocine à double composante de la classe Ia et produite par *Lactococcus lactis* DPC3147, a été démontrée contre *Staphylococcus aureus*. Le traitement à la lacticine 3147 induit une réduction significative des niveaux de *S. aureus* dans le foie, la rate et les reins des souris BALB/c infectées par *S. aureus* Xen 29 et qui ont été traitées par voie sous-cutanée avec le lanthibiotique [286]. L'usage de nisine F pour le traitement de souris infectées par *S. aureus* Xen 36 s'est avéré bactériostatique pour une durée de 15 min [287] bien que la nisine F montrait une action inhibitrice contre des souches de *S. aureus in vitro* [281, 288].

L'efficacité de la pédiocine PA-1, une bactériocine de la classe IIa et produite par *Pediococcus acidilactici* PA-1, a été suivie *in vivo* dans un modèle murin d'infection à *Listeria monocytogenes*. Une réduction de 2-log du compte de *Listeria* a été observée au niveau fécal comparé au témoin [289]. Une autre bactériocine de classe IIa, l'entéroisine CRL35 produite par *Enterococcus mundtii* CRL35, a démontré une activité inhibitrice contre *L. monocytogenes* dans un modèle murin d'infection à *L. monocytogenes* associée à la grossesse. Des réductions de comptes de *Listeria* de 1,6-log et 1-log ont été observées au niveau de la rate et du foie des souris ayant reçu l'administration orale d'entéroisine CRL35 [290].

La lacticine 3147 a démontré son efficacité à inhiber *C. difficile* dans un modèle *in vitro* simulant l'environnement fécal. En effet, à une concentration d'ajout de 18 µg/ml, la lacticine 3147 est capable d'éliminer totalement *C. difficile* (10⁶ UFC/ml) [282]. Il en est de même

pour la thuricine CD, une bactériocine de la classe Ic produite par *Bacillus thuringensis* 6431, qui a montré une activité antibactérienne à l'encontre de *C. difficile* dans un modèle distal colique [92].

Chapitre 2 Problématique, hypothèse et objectifs

2.1 Problématique

Depuis la découverte des antibiotiques, la qualité de vie a grandement été améliorée dans la lutte contre les infections, mais l'usage abusif des antibiotiques a aussi amené son lot d'effets secondaires. En effet, ils ont contribué à l'émergence de microorganismes résistants et ont permis à certains microorganismes opportunistes de sévir. C'est le cas pour les infections à *C. difficile* qui se déclarent souvent suite à une antibiothérapie. De plus, selon la littérature, les traitements utilisés commencent à montrer leurs limites avec l'apparition de souches de *C. difficile* résistantes à ces antibiotiques. Il est donc devenu nécessaire de trouver de nouvelles alternatives pour le contrôle des infections à *C. difficile*. La littérature montre que l'usage de probiotiques pourrait être une avenue intéressante dans cette lutte, particulièrement grâce à une de leurs propriétés qui est la production de molécules antimicrobiennes comme les bactériocines. Le but de ces travaux de doctorat était donc d'évaluer *Lactococcus lactis subsp lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 et sa bactériocine, la nisine, comme alternative dans le contrôle d'infections à *C. difficile*.

2.2 Hypothèse

En raison de leur nature GRAS, la souche de *Lactococcus lactis* UL719, productrice de nisine, et la nisine pourraient être proposées en tant qu'alternative pour le contrôle des infections à *C. difficile* chez l'humain.

2.3 Objectifs

Objectif 1 : Évaluer le pouvoir antimicrobien de la nisine *in vitro* contre des isolats cliniques de *C. difficile*.

Objectif 2 : Évaluer *in vitro* la capacité de la nisine et de la souche productrice, *L. lactis* UL719, à résister aux stress du tractus gastro-intestinal.

Objectif 3 : Étudier la capacité de *L. lactis* UL719 et de la nisine à inhiber *C. difficile* dans un modèle *in vitro* de fermentation colique et leurs impacts sur le microbiote colique.

Chapitre 3 La nisine est un inhibiteur efficace des cellules végétatives et de la germination des spores de *Clostridium difficile*

Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination

Christophe Le Lay¹⁻², Larbi Dridi², Michel G. Bergeron², Marc Ouellette² and Ismaïl Fliss¹

¹ STELA Dairy Research Center, Institute of Nutrition and Functional Foods, Université Laval, Québec City, QC, Canada

² Centre de recherche en Infectiologie du Centre de recherche du CHUL and Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, 2705 boul. Laurier, Québec, Canada

Publié dans *Journal of medical microbiology*, doi : 10.1099/jmm.0.000202

3.1 Résumé

Clostridium difficile est le microorganisme le plus fréquemment identifié dans les pathologies entériques chez les patients ayant une diarrhée associée à la prise d'antibiotiques ou souffrant d'une colite pseudomembraneuse. De nombreuses souches cliniques de *C. difficile* sont résistantes à des antibiotiques autres que le métronidazole et la vancomycine. Récemment, les bactériocines de bactéries lactiques ont été proposées comme une alternative ou un complément aux traitements traditionnels. Le but de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de la nisine, une bactériocine produite par certaines souches de *Lactococcus lactis*, contre des souches cliniques de *C. difficile*. La nisine Z, obtenue à partir d'une culture de *L. lactis subsp lactis* biovar. *diacetylactis*, et la nisine A ont été testées. L'effet de la nisine A sur des spores de *C. difficile* a aussi été évalué. Les deux formes de nisine ont démontré une inhibition envers toutes les souches cliniques de *C. difficile* et les CMI ont été déterminées à $6,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la nisine Z et $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la nisine A. De plus, les spores de *C. difficile* sont aussi sensibles à la nisine A ($25,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) qui entraîne une chute de la viabilité des spores de 40-50%. La nisine A inhibe la germination des spores. Ces résultats suggèrent que la nisine et les souches de *Lactococcus* productrices de nisine peuvent être utilisées pour le traitement des diarrhées associées à *C. difficile*.

3.2 Abstract

Clostridium difficile is the most frequently identified enteric pathogen in patients with nosocomial antibiotic-associated diarrhoea and pseudomembranous colitis. Several clinically isolated *C. difficile* strains are resistant to antibiotics other than metronidazole and vancomycin. Recently, bacteriocins of lactic acid bacteria have been proposed as an alternative or complementary treatment. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of nisin, a bacteriocin produced by several strains of *Lactococcus lactis*, against clinical isolates of *C. difficile*. Nisin Z obtained from culture of *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* was tested along with commercial nisin A. The effect of nisin A on *C. difficile* spores was also examined. Nisin A and Z both inhibited the growth of all *C. difficile* isolates and the MIC was estimated at $6.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for nisin Z and $0.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for nisin A. Besides, *C. difficile* spores were also susceptible to nisin A ($25.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) which dropped by 40–50 % spore viability. These results suggest that nisin and hence nisin-producing *Lactococcus* strains could be used to treat *C. difficile*-associated diarrhoea.

3.3 Introduction

Clostridium difficile, a Gram-positive anaerobic spore-forming bacterium, is an emerging pathogen capable of causing severe gastrointestinal illness in individuals undergoing antibiotic therapy [291-293]. Infection with *C. difficile* may produce a large spectrum of outcomes that range from asymptomatic colonization to acute diarrhoea and pseudomembranous colitis, which can result in colonic perforation and death if untreated [291-293]. While the vegetative form of *C. difficile* is responsible for producing the toxins that cause illness, the spore is the principal transmitted form [294]. Many antibiotics have been implicated in *C. difficile*-associated diarrhoea (CDAD), including clindamycin, ampicillin, and amoxicillin as well as the cephalosporins and fluoroquinolones [180, 295, 296]

Current treatment for CDAD is limited mainly to administration of the antibiotics metronidazole or vancomycin [297]. Furthermore, treatment failure and recurrence of infection have also been reported in respectively 2–38 % and 8–50 % of cases [5]. Based on its *in vitro* activity, its efficacy by either the oral or the intravenous route, and its low cost, metronidazole was commonly used for treatment of mild *C. difficile* infection. However, some studies reported the emergence of *C. difficile* isolates with a reduced susceptibility to metronidazole [193, 298]. Vancomycin is considered a second-line therapy, as prolonged treatment is associated with higher risk of selecting vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) besides its high cost.

It is clear that the health sector would benefit from efficacious alternatives that could be used instead of or in combination with antibiotics to combat *C. difficile*. Bacteriocins of lactic acid bacteria appear to offer one of the most promising alternatives to fight against enteric pathogens [299]. Bacteriocins are proteinaceous antimicrobial molecules that are synthesized by a ribosomal mechanism in many bacteria [300]. Their inhibitory activity may be bactericidal or bacteriostatic and is generally directed against bacteria phylogenetically close to the producer strain [246]. Lacticin 3147, a two-component lantibiotic produced by a strain of *Lactobacillus lactis* isolated from an Irish kefir grain [301], and thuricin CD, a unique two-component narrow-spectrum bacteriocin produced by a strain of *Bacillus thuringiensis*

isolated from human intestinal flora [258], are reportedly effective against *C. difficile* [258, 282]. However, these two bacteriocins do not yet have GRAS status (generally recognized as safe) and remain to be approved by regulatory authorities before use for humans (or even animals). Nisin is a polypeptide 34 amino acid residues in length produced by several strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and is inhibitory to a wide range of pathogens [302] and food spoilage agents [303]. It has GRAS status and is currently the only bacteriocin approved as a food additive. Nisin is now used as a food preservative in many countries and for the prevention of bovine mastitis. Nisin-producing strains of *L. lactis* have been isolated recently from the faeces of elderly subjects in Ireland [304]. To date, few studies have shown *in vitro* activity of nisin against *C. difficile* [305, 306]. The objective of the present study was to investigate the inhibitory effect of nisin against vegetative cells and spores of clinical isolates of *C. difficile*.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Bacterial strains and growth media

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 isolated from raw milk cheese [307] was used as the nisin Z-producing strain [308]. *Pediococcus acidilactici* UL5, from our collection, was used as the indicator organism for nisin Z activity [309]. Clinical isolates of *C. difficile* were obtained from the Université Laval Infectious Disease Research Center Culture Collection and are listed in Table 1. The bacterial cultures were maintained in 20 % glycerol stock at -80 °C. Strains UL719 and UL5 were reactivated in De Man Ragosa Sharpe (MRS) broth obtained from Difco Laboratories (Sparks, MD, USA) and were grown overnight at 30 °C. *C. difficile* isolates were reactivated in brain heart infusion (BHI) broth obtained from Difco Laboratories (Sparks, MD, USA) and were grown overnight anaerobically at 37 °C. Prior to each experiment, each bacterial culture was sub-cultured at least three times (1 % volume transfer) at 24-h intervals.

3.4.2 Antibiotics and antimicrobial substances

Erythromycin, tetracycline hydrochloride, chloramphenicol, vancomycin, metronidazole and ciprofloxacin were all obtained from the Sigma Chemical Company. Solutions of each

antibiotic at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ were prepared in water or ethanol (70 %, vol/vol) depending on the solubility index and micro-filtered (Cameo 25 N 0.22 µm membrane, MSI, Westboro, MA).

Nisin A was obtained from Nisaplin (Danisco, Copenhagen, Denmark). The standard procedure used for the production and the purification of nisin Z has been described previously [310].

3.4.3 Measurement of bacteriocin activity

Agar diffusion test described previously [310] was used. Briefly, MRS broth containing 0.75 % (w/v) agar was cooled to 47 °C and seeded at 1 % (v/v) with an overnight culture of *P. acidilactici* UL5. The medium (25 mL) was then poured into a sterile Petri dish and allowed to solidify at room temperature. Wells (7 mm diameter) were cut in the solidified agar using a sterile metal cork borer and were filled with 80 µl of nisin solution. The plates were left at 4 °C for 2 h to allow diffusion of the tested aliquot and were then incubated at 30 °C. The diameter of the inhibition zones (Fig. 3.1) was measured after 18 h.

3.4.4 Susceptibility of *C. difficile* isolates to antibiotics and to nisins A and Z

The minimal inhibitory concentration (MIC) of the antimicrobial agents was determined using a micro-plate assay described previously [311]. The optical density at 650 nm (OD₆₅₀) of a mid-log phase culture of *C. difficile* grown in BHI broth was adjusted to 0.1 with fresh BHI broth using a Spectronic 20 spectrophotometer (Bausch & Lomb. Inc., Rochester, NY). The viable count in this inoculum was determined using 10-fold dilutions (in 0.1 % [w/v] peptone water) plated on BHI agar and incubated anaerobically at 37 °C for 24–48 h. These counts were found to range from 5×10⁵ to 1×10⁶ CFU.mL⁻¹. A two-fold serial dilution of antimicrobial agent or antibiotic in BHI broth (125 µL) in a polystyrene micro-plate (Becton Dickinson Labware) was inoculated with bacterial suspension (50 µL) to obtain approximately 2.5–5.0×10⁴ CFU per well, as per the CLSI (formerly Clinical and Laboratory Standards Institute) standard method. The micro-plates were incubated anaerobically at 37 °C for 24 h. The OD₆₅₀ was read using a Thermomax micro-plate reader (Molecular Devices, Opti-Resources, Charny, PQ, Canada). Positive controls (inoculated wells without antimicrobial agent) and negative controls (un-inoculated wells containing broth medium and

antimicrobial agent) were included. The MIC was the lowest concentration of the tested agent giving complete inhibition of growth (OD equal to the OD of the negative control). The micro-plate assay was repeated four times for each combination of antimicrobial agent and bacterial strain, and the MIC was determined as the median of the four repetitions. In accordance with the guidelines established by the CLSI for anaerobic bacteria [312] and EUCAST (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), the breakpoints used were 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for vancomycin, 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for erythromycin, 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for tetracycline, and 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for metronidazole and chloramphenicol. For antimicrobial agents to which no standard breakpoints to *C. difficile* have been defined, breakpoints were considered as follows: ciprofloxacin $\geq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [313].

3.4.5 Transmission electron microscopy

C. difficile ATCC 630 was fixed for 1 h at 4 °C in cacodylate buffer (pH 6.9) containing 1 % (v/v) paraformaldehyde and 2 % (v/v) glutaraldehyde. The suspensions were centrifuged and dehydrated by successive washes with ethanol for 30 min. The *C. difficile* pellets were embedded in Spurr resin and ultra-thin sections were obtained (Ultratome III; LKB, Bromma, Sweden), mounted on a 0.5 % Pioloform-coated copper grid (3.05 mm diameter) and stained with 3 % aqueous uranyl acetate and 0.1 % lead citrate prior to imaging using a JEOL transmission electron microscope (model 1200).

3.4.6 Spore preparation

A BHI agar plate was inoculated with an overnight culture of *C. difficile* ATCC 630 and incubated at 37 °C under anaerobic conditions for five days. Spores were recovered from the agar using sterile distilled water. For spore purification, spores were cleaned by repeated centrifugation and washing with sterile distilled water until they were 99% free of sporulating cells, cell debris, and germinated spores, as assessed by phase-contrast microscopy. Cleaned spores were suspended in sterile distilled water [314] and stored at -20 °C until further use. The number of spores per ml was counted directly by phase-contrast microscopy using a counting chamber (Petroff-Hausser Bacteria Counter, Hausser Scientific).

3.4.7 Spore viability in the presence of nisin

A solution of nisin A prepared at 3.2, 12.8 or 25.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was added to suspension containing 2×10^5 spores of *C. difficile* per mL and the mixture was incubated for 1 h or 24 h at 37 °C then centrifuged. The pellet was washed and then plated on BHI agar containing 0.1 % sodium taurocholate (as germinating agent) and incubated at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions. The resulting vegetative cells were counted and compared to a control not treated with nisin.

3.4.8 Effect of nisin on *C. difficile* spore germination

To determine the effect of nisin on spore germination, a suspension containing 2×10^5 spore.mL⁻¹ was plated on BHI agar containing 0.1 % sodium taurocholate and 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 1.6 or 3.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of nisin A. The plates were incubated at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions. The resulting colonies were counted and compared to a control not treated with nisin.

3.4.9 Statistical analyses

The data were analyzed using the SAS version 9.2 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Experimental values are reported as mean \pm SD. The statistical significance of the differences between treatments was evaluated using a one-way ANOVA *t*-test. The level of significance was $P \leq 0.05$.

3.5 Results

3.5.1 Susceptibility of clinical isolates of *C. difficile* to antibiotics and nisin

The susceptibilities of clinical isolates of *C. difficile* to antibiotics and nisin A and Z are summarized in Table 3.1. All tested strains (23) were susceptible to metronidazole, vancomycin and chloramphenicol according CLSI breakpoints, with MIC range of <1, <1–1.5 and 1–6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. Of tested strains, 22 isolates were resistant to at least one antibiotic. In particular, a high number of resistant isolates to ciprofloxacin was recorded (21/23) with a MIC range of 8–128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In a lesser extent, a total of 8/23 and 1/23 isolates were resistant to erythromycin and tetracycline, respectively. In comparison, *C. difficile* isolates were more sensitive to nisin A than to nisin Z, with respective susceptibilities ranged from 0.8 to 51.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and from 6.4 to 51.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. We also noted that strain CCRI9238 was the less sensitive, with MIC values of 51.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for both nisins, while strain CCRI9242 was the most sensitive, with MICs of 0.8 and 6.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for nisins A and Z respectively.

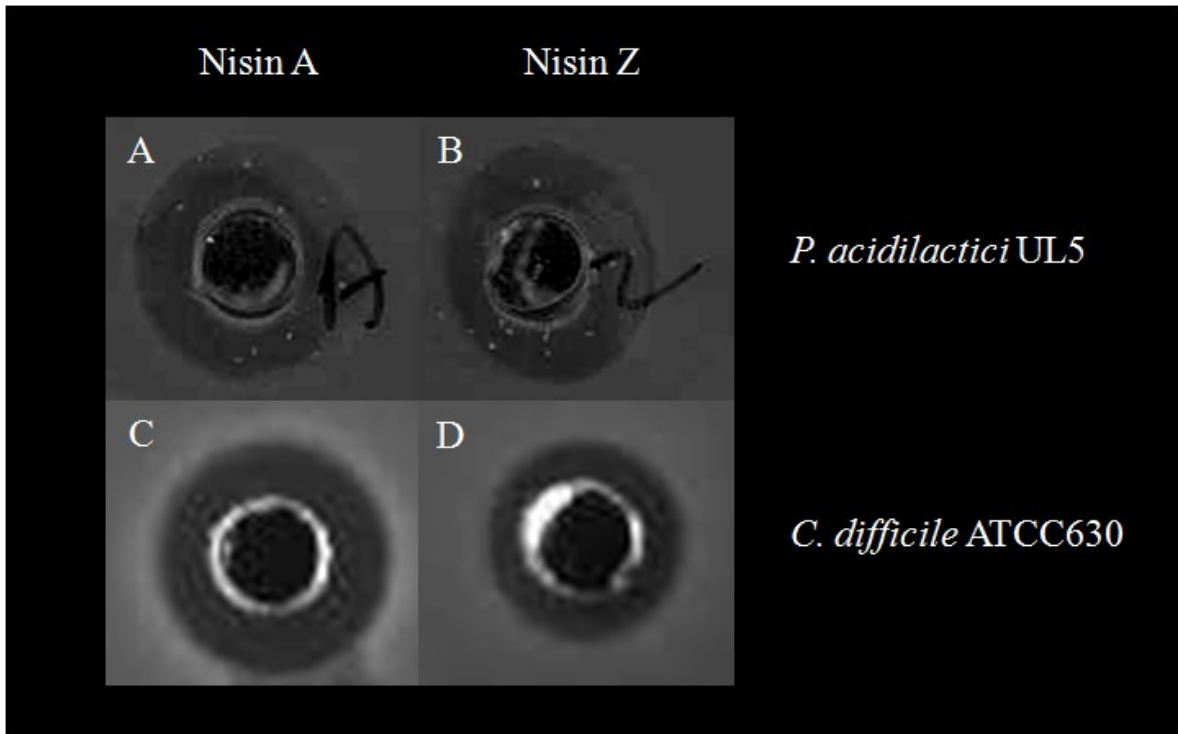


Figure 3.1 Inhibitory activity of bacteriocins nisin A and nisin Z against *P. acidilactici* UL5 (sensitive strain) and *C. difficile* ATCC 630, as revealed by zones of clearing in the agar diffusion assay.

Table 3.1 Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)^a of bacteriocins and antibiotics against strains of *Clostridium difficile*.

Strain/Isolate ^{b, c}	Bacteriocin						Antibiotic ^d							
	Nisin A		Nisin Z		Cip	Van	Met		Ery		Chl		Tet	
<i>C. difficile</i> ATCC 630	3.2	12.8	6	S	<1	S	<1	S	>512	R	4	S	32	R
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	12.8	12.8	8	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9233	3.2	12.8	12	R	1,5	S	<1	S	<1	S	6	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9234	1.6	12.8	8	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9235	4	25.6	8	R	<1	S	<1	S	<1	S	3	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9236	2	12.8	8	R	<1	S	<1	S	>512	R	6	S	4	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9237	8	12.8	12	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9238	51.2	51.2	8	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9239	12.8	6.4	8	R	<1	S	<1	S	<1	S	2	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9240	1.6	12.8	16	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9241	3.2	12.8	16	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9242	0.8	6.4	8	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9243	6.4	25.6	8	R	<1	S	<1	S	>512	R	3	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 9244	6.4	12.8	12	R	<1	S	<1	S	<1	S	3	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 15900	6.4	25.6	128	R	<1	S	<1	S	>512	R	<1	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 15901	3.2	25.6	128	R	<1	S	<1	S	>512	R	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 16713	4.8	25.6	12	R	<1	S	<1	S	<1	S	6	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 16714	4.8	12.8	8	R	<1	S	<1	S	<1	S	4	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 18278	4.8	25.6	8	R	<1	S	<1	S	>512	R	6	S	6	S
<i>C. difficile</i> CCRI 18279	4.8	25.6	24	R	<1	S	<1	S	>512	R	3	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 18283	3.2	12.8	6	S	<1	S	<1	S	<1	S	3	S	<1	S
<i>C. difficile</i> CCRI 18291	3.2	12.8	12	R	<1	S	<1	S	>512	R	5	S	<1	S
<i>C. difficile</i> ATCC 43255	12.8	51.2	32	R	<1	S	<1	S	<1	S	<1	S	<1	S

^a Median of four repetitions. ^b ATCC: American Type Culture Collection. ^c CCRI: Université Laval Infection Research Center Culture Collection. ^d Cip, Ciprofloxacin (breakpoint $\geq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$); Van, Vancomycin (breakpoint $\geq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$); Met, metronidazole (breakpoint $\geq 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); Ery, Erythromycin (breakpoint $\geq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$); Chl, Chloramphenicol (breakpoint $\geq 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); Tet, Tetracycline hydrochloride (breakpoint $\geq 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$). S: sensitive, R: resistant.

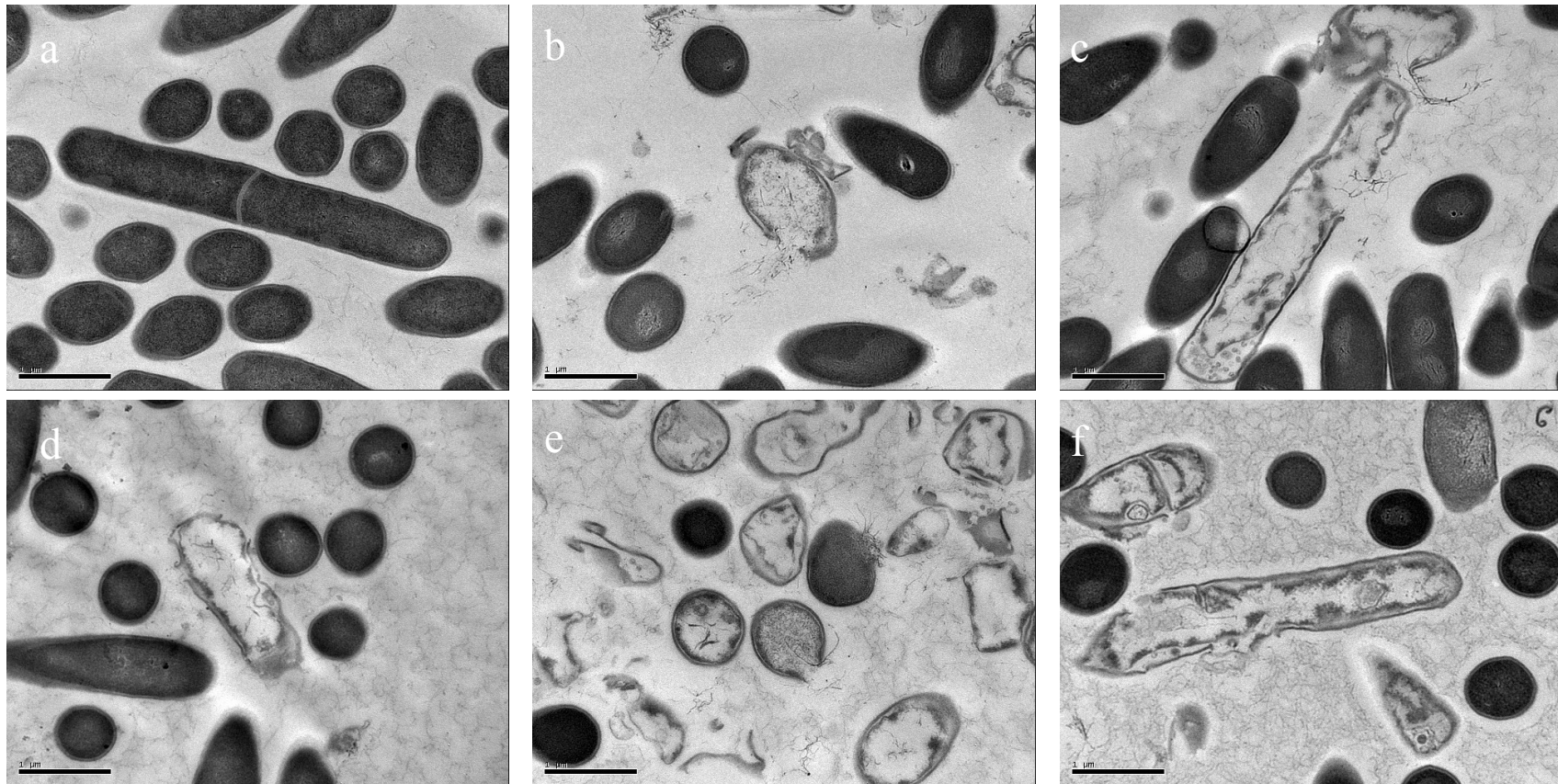


Figure 3.2 Transmission electron micrographs of *C. difficile* ATCC 630 grown in BHI broth and treated in suspension (10^6 CFU) for 1 min with (a) no inhibitor; (b) nisin A ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (c) nisin Z ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (d) vancomycin ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (e) nisin A ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and (f) nisin Z ($128 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Bar = $1 \mu\text{m}$.

3.5.2 Transmission electron microscopy

Fig. 3.2 shows the electron micrographs of nisin-treated and untreated *C. difficile* vegetative cells. Untreated cells suspended in BHI without nisin exhibited a completely intact cell structure (Fig. 3.2a). However, treatment with nisin A for 1 min at concentrations of 16 and 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 3.2b and 3.2c) was associated with significant holes in the cell membrane and release of cytoplasmic contents, likely causing cell death. This is widely believed to be the basis for the antibacterial activity of nisin. Similar results were observed with nisin Z at 32 and 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 3.2e and 3.2f).

3.5.3 Effect of nisin A on *C. difficile* spores

The effect of nisin A on *C. difficile* spores was evaluated by counting germination at different concentrations. Fig. 3.3 shows that the impact on spore viability is weak at 3.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Viability ranged from 82 to 99 % after 1 h and 24 h of contact with nisin. At higher concentrations, nisin appeared to cause a statistically significant decrease in viability, to 79–81 % at 12.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($P \leq 0.05$) and to 40–50 % at 25.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($P \leq 0.05$).

3.5.4 Effect of nisin A on *C. difficile* spore germination

Fig. 3.4 shows the effect of nisin A on taurocholate-induced germination of *C. difficile* spores. Germination dropped by $0.3 \log_{10} \pm 0.08$ and $0.8 \log_{10} \pm 0.4$ in the presence of nisin at concentrations of 0.1 and 0.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively. At higher concentration (0.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), significant decreases in germination ($> 1.8 \log$) were obtained.

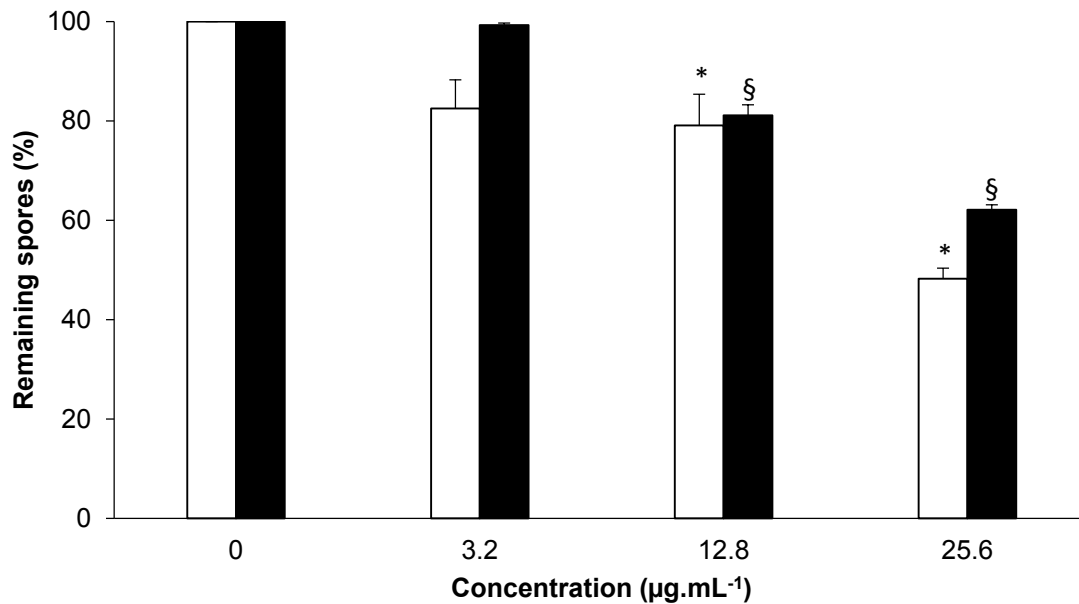


Figure 3.3 Viability of *C. difficile* spores treated with nisin A at different concentrations for 1 h (white) and 24 h (black). Spores were washed, plated on BHI agar containing sodium taurocholate and incubated anaerobically for 24 h at 37 °C. Germinated spores were counted. Values are mean \pm SD for four separate experiments. Symbols indicate significant difference between viability in the presence and absence of nisin ($P \leq 0.05$).

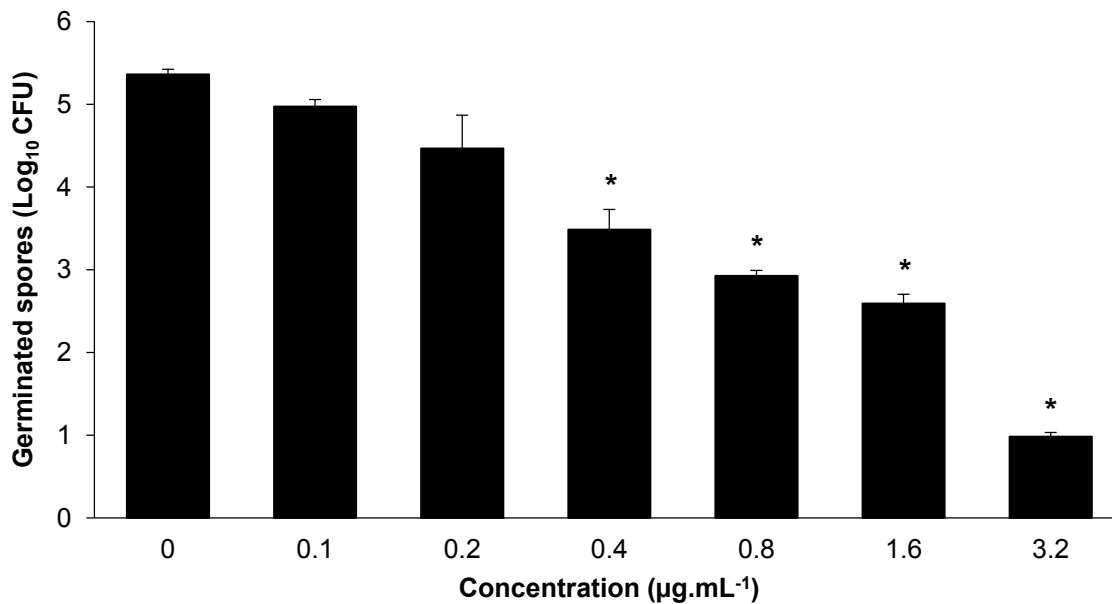


Figure 3.4 Inhibition of *C. difficile* spore germination by nisin A. Spores were plated on BHI agar containing sodium taurocholate and bacteriocin and incubated anaerobically for 24 h at 37 °C. Values are mean \pm SD for four separate experiments. Asterisks indicate significant difference between viability in the presence and absence of nisin ($P \leq 0.05$).

3.6 Discussion

In recent years, bacteriocins have attracted increasing attention in medicine, with their highly specific activity at nanomolar range, non-toxicity to humans, unique mechanism of action, and low propensity to generate resistance. Many bacteriocins have been assessed for potential application as therapeutic agents [299]. In this study, we investigated the potential of nisin as anti-infective agent for treating *Clostridium difficile* by examining the susceptibility of 20 clinical isolates and three ATCC strains to nisin A and Z as well as six antibiotics including vancomycin and metronidazole, two drugs commonly used for the treatment of *C. difficile* infection.

In this study, nisin A was more potent than its Z variant, thus residue 27 (His for nisin A, Asn for nisin Z) [315] is likely important for bacteriocin action on *C. difficile* cells. Other studies have shown that the MIC differed between nisin A and nisin Z for the same target organism [17]. Our results for nisin A are comparable to the MICs obtained for lacticin 4137, a bacteriocin that shows great promise for the treatment of *C. difficile* infection. Lacticin 4137 MIC₅₀ values ranging from 0.95 to 15 µg.mL⁻¹ have been found for a bank of *C. difficile* isolates using the agar dilution test method [282]. Another bacteriocin inhibitory to *C. difficile* is thuricin CD, for which MICs of 0.125–0.5 µM (the range for nisin A in the present study is 0.238–15.2 µM) have been reported for 19 strains including 13 clinical isolates [316]. The nisin A MICs determined in the present study compare favorably with a range (0.5–4.0 µg.mL⁻¹) reported previously for vancomycin or metronidazole [317], indicating that this bacteriocin is at least as effective as the antibiotics used commonly to treat *C. difficile* infection.

Unlike vegetative *C. difficile*, spores are highly resistant to chemical disinfectants and antibiotics. By altering the normal composition of the protective colonic microbial flora, antibiotic treatments create favourable conditions for colonization and hence infection by *C. difficile* [178, 318]. However, spores require the presence of certain compounds in order to undergo germination. It has been shown that *C. difficile* spores germinate in the presence of the secondary bile salt taurocholate, which acts as a co-germinant with glycine [294]. We therefore investigated the antimicrobial effect of nisin on *C. difficile* spores viability and germination in a medium containing taurocholate. At a concentration of 3.2 µg.mL⁻¹, nisin

did not inhibit significantly spores. Nerandzic and Donskey [319] reported similar results with no inhibition of dormant spores at the same nisin concentration ($3.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). In this study, a concentration of $12.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ or higher is required for nisin to inhibit *C. difficile* spores. In instance, the germination of *C. difficile* spores dropped by 40–50 % after treatment with a high concentration ($25.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) of nisin A. We have shown that nisin is able to inhibit the outgrowth of *C. difficile* (\log_{10} reduction > 4 at $3.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) after germination is initiated. Other bacteriocins have been shown to inhibit the germination of bacterial spores, for example lacticin 3147 produced by *Lactococcus lactis* IFPL 3593 against *Clostridium tyrobutyricum* [320], bacteriocin AS-48 produced by *Enterococcus faecalis* A-48-32 against *Bacillus cereus* [321], nisin against *Bacillus cereus* [322] and *Bacillus anthracis* [323, 324]. Nisin inhibits Gram-positive vegetative bacterial cells by two mechanisms, namely membrane pore formation and interfering with cell-wall biosynthesis [325, 326]. Gut *et al.* [323, 324] have studied the inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by nisin. Showing first that nisin had an inhibitory action on the germinated spores, they then generated nisin molecules coupled to fluorescein for epi-fluorescence microscopy, which allowed them to locate the site of action at the poles of the spores. The binding site corresponded to the localization of lipid II, which is required for the biosynthesis of new cell wall during the outgrowth process. They also demonstrated that the effect on the lipid II alone was not sufficient to inhibit growth and concluded that the inhibitory mechanism of nisin on the outgrowth of *Bacillus anthracis* spores was the combination of binding lipid II and membrane disruption.

Several studies on the emergence of *C. difficile* isolates are being reported, with a reduced susceptibility to metronidazole [193, 298], and high risks of selecting of resistant VRE. With treatment failures and recurrent of infections [5], there is an urgent need for novel antimicrobial treatments. In this study, we have shown the capacity of nisin to inhibit *in vitro* both *C. difficile* vegetative cells and spore germination. Further *in vivo* experiments are required, before possible application of nisin as therapeutic agent for treatment of *C. difficile* infection.

3.7 Acknowledgments

The National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) provided financial support for this work. Work in the laboratory of MO was supported by CIHR, and MO holds a Canada Research Chair in antimicrobial resistance.

Chapitre 4 Survie de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* UL719 aux conditions du tractus gastro-intestinal proximal dans un modèle *in vitro* dynamique.

Survival of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* UL719, in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic *in vitro* model

Christophe Le Lay¹, Ehab Kheadr¹⁻² and Ismaïl Fliss¹

¹ STELA Dairy Research Center, Institute of Nutrition and Functional Foods, Université Laval, Québec City, QC, Canada

² Functional Foods and Nutraceutical Laboratory, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Egypt

4.1 Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer la survie de *Lactococcus lactis* UL719, pour déterminer sa capacité à produire la nisine Z et pour suivre la stabilité biologique de la nisine Z en utilisant le TIM-1, un modèle entièrement validé pour simuler les conditions de la partie supérieure du tractus gastro-intestinal (TGI) humain.

L. lactis UL719, cultivé dans du lait écrémé, a été introduit dans le système TIM-1. Les échantillons ont été prélevés dans différents compartiments du TIM-1 à différents temps pendant les 5 heures de digestion. L'effluent récupéré à la sortie de l'iléon montre un taux de survie de *L. lactis* UL719 de 0,45 % à la fin de la digestion. Toutes les souches de *L. lactis* UL719 récupérées dans les différents compartiments sont capables de produire la nisine et au même niveau que les souches non stressées. Par contre, l'activité antimicrobienne de la nisine Z purifiée est stable au niveau de l'estomac, mais perd son activité au niveau du duodénum, dû à l'action des enzymes protéolytiques contenues dans le jus pancréatique.

Lactococcus lactis UL719 semble être un potentiel candidat probiotique grâce à sa capacité à survivre et à garder sa capacité à produire la nisine Z dans les conditions du TGI. Par contre, la nsine Z purifiée doit être protégée par une encapsulation pour être libérée au niveau de son site d'action.

4.2 Abstract

The purpose of this study was to evaluate the survival of *Lactococcus lactis* UL719, to determine its ability to produce nisin Z and to assess the biological stability of purified nisin Z using the TIM-1 system, which is fully validated to simulate the human upper gastrointestinal tract (GIT).

Skim milk culture of *L. lactis* UL719 was fed to TIM-1 systems. Samples were collected from TIM-1 in different compartments at different times during the five hours of the digestion. The ileal delivered efflux showed a survival rate of 0.45 % at the end of the digestion. *L. lactis* UL719 recovered from different compartments was able to produce nisin at the same level as unstressed cells, whereas the antibacterial activity of purified nisin Z was stable under stomach condition but was lost after its passage through the duodenal compartment and the action of proteolytic enzyme contains in the pancreatic juice.

Lactococcus lactis UL719 seems to be a potential probiotic candidate because of its acceptable survival rate and its capacity to produce nisin Z was not affected by GIT conditions. However, purified nisin Z needs to be protected by encapsulation to be delivered to the action site.

4.3 Introduction

Probiotics are defined as live organisms which, when administered in sufficient amounts, can have a beneficial effect on the host's health [9]. Many beneficial health effects have been associated with the consumption of probiotics [327] including the restoration of the balance of the intestinal microbiota following antibiotic treatment and inhibition of enteric pathogens. The inhibitory activity of probiotics has been recently reviewed in detail by our team [238, 328]. Probiotics have been proven to exert inhibition activity against several pathogens such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, rotavirus [329] and to be effective in a variety of conditions including traveller's diarrhoea, antibiotic-associated diarrhoea, upper respiratory tract infection, atopic eczema and some inflammatory conditions [330, 331]. The antimicrobial activity of probiotic bacteria involves several mechanisms including modulation of the intestinal immune system, displacement of potential pathogens via competitive exclusion or production of antimicrobial agents [331]. Antimicrobial activity is thought to be an important means for probiotic bacteria to competitively exclude or inhibit invading bacteria [332, 333]. Some do so by secreting non-specific antimicrobial substances, such short-chain acids [332] or hydrogen peroxide [334] or bacteriocins [328, 335].

Bacteriocins are small antimicrobial peptides of ribosomal synthesis, produced by many Gram positive and Gram negative microorganisms [246]. A complete review of these bacteriocins and their characteristics are presented in the Bactibase database which was recently developed by our team [336, 337]. The synthesis of bacteriocins is studied in Lactic Acid Bacteria (LAB) given the potential applications they offer, for example, as a biopreservation agent for food [278] or as an alternative to antibiotics for medical [258, 282] and veterinary use [338]. More recently, the production of bacteriocins is increasingly seen by many scientists as an important trait for selection of potentially probiotic strains [339]. Despite the diversity of mechanisms proposed, very few are scientifically well documented. For example, the involvement of bacteriocins in the prevention of enteric infections by probiotics is not yet clearly demonstrated and the results reported in the literature are contradictory. While some studies attempting to confirm the involvement of bacteriocins *in vivo* inhibitory activity of probiotics, others tend to prove the contrary. Nisin, a bacteriocin that belong to the lantibiotic family, is produced by number of strains of *Lactococcus lactis*

subsp *lactis* [302, 332]. Nisin has been used as a food preservative because of its high antimicrobial activity and no toxicity for humans [302]. This bacteriocin shares some properties with other pore-forming antibacterial peptides, such as cationic peptides displaying a net positive charge and amphipathicity [302, 340]. The mode of action of nisin involves an interaction with the membrane-bound cell wall precursor lipid II, concomitant with pore formation in the cytoplasmic membrane of target organism [341, 342]. Recent studies have also shown that nisin displays high antibacterial activity against multi-resistant *Streptococcus pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Clostridium difficile* [17, 343].

Previous study [344], carried out within our research group, has shown high survival of a potential probiotic, *Pediococcus acidilactici* UL5, through the gastrointestinal tract. We have also shown that production of pediocin PA-1 by *P. acidilactici* UL5 was not affected by stressful conditions encountered in the stomach and the small intestine. In another study, we have shown that *L. lactis* ATCC11454, a nisin A producing strain, was able to survive the transit through the GIT at a very low level (0,0007 %). During this transit *L. lactis* ATCC11454 was able to express those bacteriocin production gene and bacteriocin production by the strain at the end of the system was not affected by the stressful condition [345]. A recent study [304] has succeeded in isolating nisin Z *Lactococcus lactis* producer from the intestinal microbiota of elderly Irish. These results bring more evidence that bacteriocin production can be considered as a potential probiotic trait. It also suggests that unexpected species such as *L. lactis* may represent a potential probiotic strains.

The aim of this study is to evaluate the survival of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* UL719, a nisin Z producing strain, under gastrointestinal conditions using a dynamic GIT model (TIM-1). It also aims to study the effect of GIT stressful conditions on the ability of *Lactococcus lactis* UL719 to produce nisin Z.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Bacterial strains and growth media

Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. *diacetylactis* UL719, isolated from raw milk cheese [346] was used as a nisin Z-producing strain [308]. *Pediococcus acidilactici* UL5, from our collection, was used as the indicator organism for the nisin Z inhibition assay [309]. Strains were maintained in 20 % glycerol stock at -80 °C. *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 and *P. acidilactici* UL5 were reactivated in De Man Ragosa Sharpe (MRS) broth [347] obtained from Difco Laboratories (Sparks, MD, USA). Each bacterial culture was cultivated overnight at 30 °C. Prior to each experiment, each bacterial strain was subcultured at least thrice (inoculation at 1 %, v/v) for 24 h.

4.4.2 Nisin Z production and purification

We used the standard procedure for the purification of nisin Z as described by Le Lay *et al.*, [310].

4.4.3 TIM-1 dynamic model

The dynamic GI TIM-1 model (TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, the Netherlands) described previously by Minekus *et al.*, [348] is presented in Figure. 4.1. The model consists of four compartments connected in series to simulate the stomach, duodenum, jejunum and ileum, which are connected by computer-controlled peristaltic valve pumps. The disinfection and preparation of the model were already described by Kheadr *et al.*, [344].

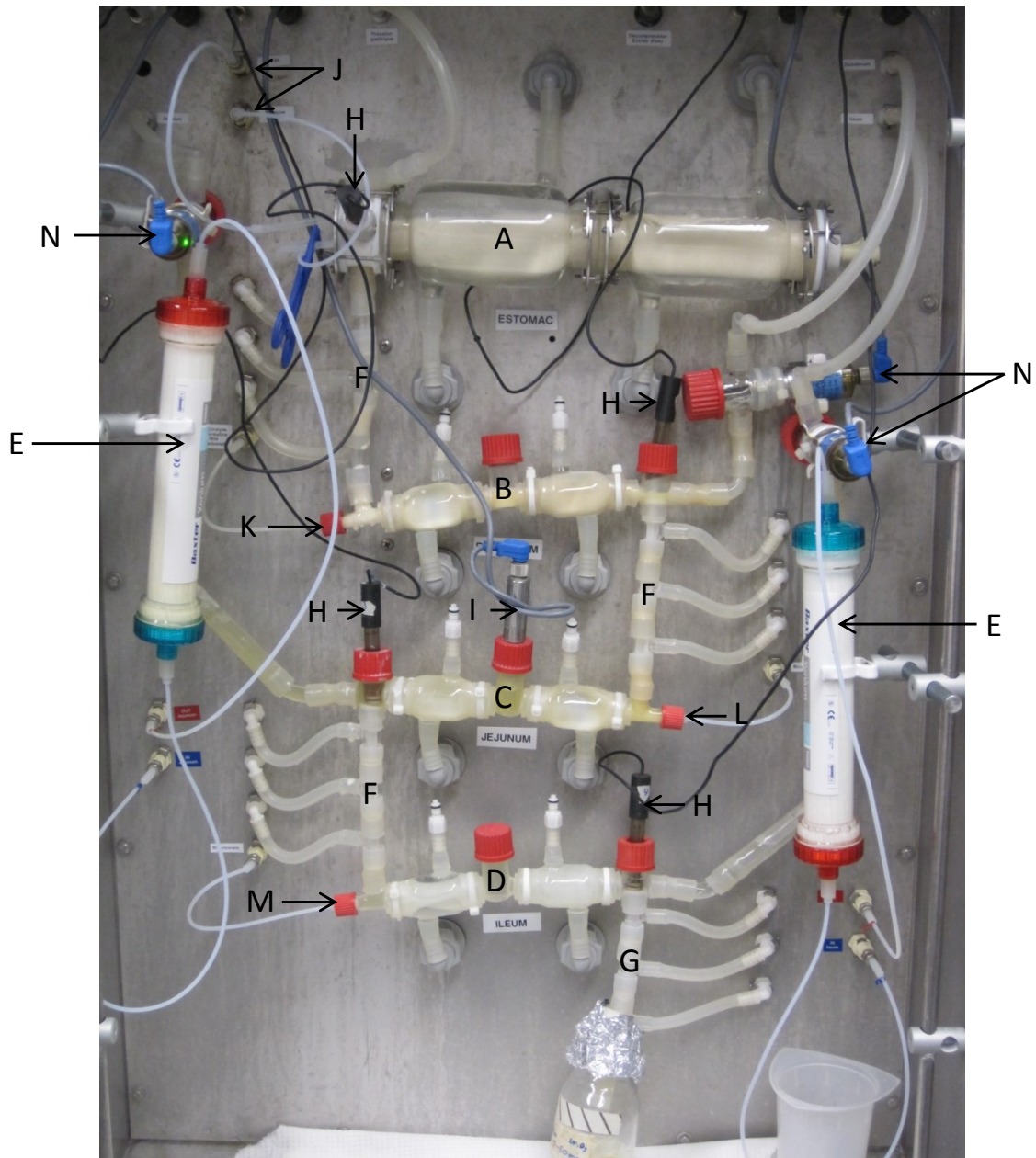


Figure 4.1 the multi-compartmental dynamic TIM-1 model of gastrointestinal system. Vessels A, B, C and D constitute the gastric, duodenal, jejunal and ileal compartments, respectively. Modules (E) are semi-permeable hollow fibre membrane dialysis units. (F) Peristaltic valves, (G) ileo-caecal valves, (H) pH electrodes, (I) temperature sensor, (J) stomach secretion inlets, (K) duodenal secretion inlets, (L) and (M) bicarbonate secretion inlet and (N) volume detecting sensors.

4.4.4 Digestion and sampling

Gastric pH was initially 5.5 and decreased gradually, by injecting 1 mol.L⁻¹ HCl, to 2.7 after 40 min, 2.2 after 60 min and 1.8 after 90 min of digestion and remained constant at 1.7 from 120 to 360 min. The pH in the duodenal, jejunal and ileal compartments was adjusted to 6.5, 6.8 and 7.2, respectively, by injecting 1 mol.L⁻¹ sodium bicarbonate solution. Gastric secretions consisted of pepsin (0.28 mg.mL⁻¹) from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1; Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) and lipase (0.25 mg.mL⁻¹) from *Rhizopus oryzae* (EC 3.1.1.3; Amano Pharmaceuticals, Nagoya, Japan), both in an electrolyte solution (NaCl, 3.0 g.L⁻¹; KCl, 1.1 g.L⁻¹; CaCl₂, 0.15 g.L⁻¹; NaHCO₃, 0.60 g.L⁻¹) delivered at flow rates of 0.25 and 0.13 mL.min⁻¹, respectively. Duodenal secretions consisted of 7 % pancreatin solution (Pancrex V powder; Paines and Byrne, Greenford, UK) in reverse osmosis-purified (RO-purified) water and 4 % porcine bile extract (Sigma-Aldrich Canada Ltd) as well as small intestine electrolyte solution (NaCl, 5.0 g.L⁻¹; KCl, 0.60 g.L⁻¹; CaCl₂, 0.30 g.L⁻¹; pH 7.0) were injected, respectively, at 0.25, 0.5 and 0.25 mL.min⁻¹, and the total injected volumes were logged. According to the manufacturer, 1 g of Pancrex V powder contains 1400, 25 000 and 30 000 British Pharmacopoeia units of free protease, lipase and amylase, respectively.

The GI survival study of *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 were performed in duplicate. *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 was grown in 12 % (w/v) skim milk for 24 h at 37 °C. The purified nisin Z solutions were prepared at a concentration of 10 mg per 300 mL with milk acidified by HCl (4N) at pH 5.3. Digestion followed a slow transit protocol suggested by Minekus *et al.*, [348] with delivery half times of 70 and 160 min, respectively, for the gastric and ileal compartments, based on curve fit calculations of gastric and ileal delivery data obtained by [349, 350] from human volunteers ingesting yoghurt. For skim milk culture digestions, aliquots of 1 ml were taken in duplicate at 0, 35, 70 and 105 min from the gastric compartment, at 30, 60, 90, 120 and 180 min from the duodenal compartment and at 60, 120, 180, 240 and 300 min from the jejunal and ileal compartments for *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 viable count determination. Additional 1 ml aliquots were taken in duplicate from each compartment to determine nisin Z activity. For nisin activity, all aliquots collected were immediately placed in a water bath at 100 °C for 10 min and then centrifuged at 8250 g for 10 min to eliminate

digestive enzyme activity. Inhibition activity of nisin Z was measured using the agar well diffusion and critical-dilution micro-methods. To distinguish bacteriocin activity from the effects of bile, a negative control in which 300 mL of milk acidified by HCl (4N) at pH 5.3 without nisin was run using the same digestion protocol.

4.4.5 Assessment of bacteriocin activity

Bacteriocin activity was quantified by two different methods: the agar well diffusion test and the critical-dilution micromethod.

4.4.5.1 Agar well diffusion test

Bacteriocin activity was qualitatively determined by the agar well diffusion method, as described by Le Lay *et al.*, [310]. Briefly, 25 mL of molten MRS containing 0.75 % (w/v) agar medium were cooled at 47 °C and seeded with 1 % (v/v) of an overnight culture of *P. acidilactici* UL5. Seeded agar was then poured into a sterile Petri dish and allowed to solidify at room temperature. Wells (7 mm) were cut in the solidified agar using a sterile metal cork borer and were filled with 80 µL of sample of nisin Z. The plates were left at 4 °C for 2 h to enable the diffusion of the tested aliquot and were then incubated at 30 °C for 18 h, after which time the absence or presence and the diameter of the inhibition zones were determined.

4.4.5.2 Critical-dilution micromethod

Twofold serial dilutions of 125 µL of the tested sample were added to wells of a flat-bottomed microtest® polystyrene microplate (96-well microtest; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Each well contained 125 µL of MRS broth and was inoculated with 50 µL of 1000-fold diluted *P. acidilactici* UL5 overnight culture (final concentration of 10^6 CFU.mL⁻¹) [308]. Plates were incubated at 30 °C for 18 h and absorbances at 650 nm were then measured using a Thermo-max molecular device spectrophotometer (OPTIResources, Quebec, PQ, Canada). Bacteriocin activity, expressed in arbitrary units per millilitre (AU.mL⁻¹), was defined as the highest bacteriocin dilution showing complete inhibition of the indicator strain (absorbances equal to that in the uninoculated medium),

calculated as: $AU \cdot mL^{-1} = 2^{n*}(1000/125)$, where n is the number of wells showing inhibition of the indicator strain

4.4.6 Double-agar layer technique

The ability of *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 to produce nisin Z after passage through the GIT was studied using a double-agar layer activity technique developed by Kheadr *et al.*, [344]. Fifteen to twenty colonies of *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 grown on MRS agar from sample taken at the end of gastric phase (105 min), duodenal phase (180 min) and jejunal and ileal phases (300 min) were selected randomly and suspended separately in lactobacilli MRS broth and incubated at 37 °C for 16 h. Thereafter, 2 µL of MRS culture of each colony was spotted onto the surface of MRS containing 1.5 % (w/v) agar (Difco) and the plates were left to dry for 30 min in a laminar flow cabinet. Following incubation at 37 °C for 16 h, colonies were treated with 10 µL chloroform (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) for 1 min and plates were left in the laminar flow cabinet for 5 min to evaporate traces of solvent. A second layer of 25 mL of MRS containing 0.8 % (w/v) agar and seeded with 150 µL of an overnight culture of *P. acidilactici* UL5 was added. After agar solidification, the plates were incubated at 30 °C for 18 h and then examined for the presence of inhibition zones and compared with zones produced by *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 colonies recovered from skim milk culture and did not subject to *in vitro* digestion by TIM-1 model.

4.4.7 Statistical analyses

The data were analyzed using the SAS version 9.2 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Experimental values are given as means \pm SD. The statistical significance of the differences between treatments was evaluated using a one-way ANOVA t-test. The level of significance was $P \leq 0.05$.

4.5 Results

4.5.1 Survival of *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 in the dynamic GI TIM-1 model

Figure 4.2(a) illustrates the digestion profile and sample distribution among the different compartments during the 5 h digestion of skim milk fermented by *L. lactis* UL719. These values are calculated from sensor data (e.g. volume sensors) and digital inputs (e.g. valve openings and closures) and logged as a function of time by means of computer interface and software [344].

The ability of *L. lactis* UL719 to survive in skim milk under the simulated GI conditions is presented in Figure 4.2(b). The initial count of *L. lactis* UL719 in the gastric compartment, at the beginning of digestion, was approx. $1.08 \pm 0.17 \times 10^9$ CFU.mL⁻¹. It dropped to $9.01 \pm 0.08 \times 10^8$, $2.11 \pm 0.07 \times 10^8$ and $4.94 \pm 0.41 \times 10^4$ CFU.mL⁻¹ milk after 35, 70 and 105 min of digestion, respectively. This loss of viability was conspicuously associated with the pH drop below 2 after 70 min of digestion in this compartment, while the initial drop from 5.3 to 3.2 during the first 35 min did not result in significant ($P < 0.05$) reduction in viability of *L. lactis* UL719.

The initial count of *L. lactis* UL719 in the duodenum compartment after 30 min of digestion was about $3.36 \pm 0.38 \times 10^6$ CFU.mL⁻¹ milk, which was reduced significantly ($P < 0.05$) to $3.71 \pm 0.41 \times 10^5$, $4.14 \pm 0.92 \times 10^3$, $6.45 \pm 0.08 \times 10^1$ and $4.15 \pm 0.00 \times 10^1$ CFU.mL⁻¹ milk after 60, 90, 120 and 180 min of digestion, respectively (Figure 4.2b). This reduction may be due to the inhibition activity of bile salts and pancreatin enzymes. In this compartment, the pH was stable around 6.5. In the jejunal and ileal compartments, the viable counts of *L. lactis* UL719 remain relatively stable between 1×10^6 and 5×10^5 CFU.mL⁻¹ milk during the digestion. Based on the initial cells counts, *L. lactis* UL719 was found with a survival rate of 0.45 ± 0.052 %.

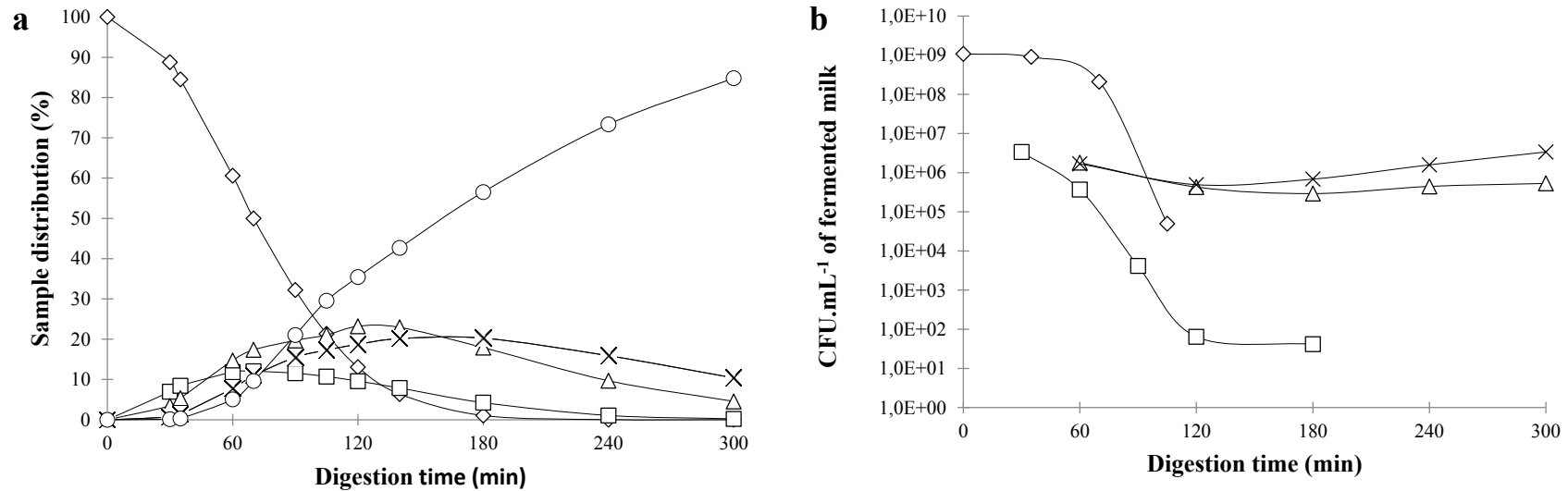


Figure 4.2 Proportion (%) of fermented milk sample distributed in the compartments of TIM-1 model or cumulated in ileal-delivered effluent (a) and survival of *Lactococcus lactis* UL719 (CFU.mL⁻¹ of fermented skim milk) in the compartments of the TIM-1 model during 5h digestion (b)(stomach (diamond); duodenum (square); jejunum (triangle); ileum (cross); efflux(circle)). Percentages were calculated by Shortcut to Timall 041201 software (TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands) for the slow transit protocol. Data are means of two independent repetitions.

4.5.2 Capacity of the strain to produced nisin after passage through GIT

Viable cells of *L. lactis* UL719 were harvested from gastric, duodenal and at the end of the ileum compartments after 105, 180 and 300 min, respectively. The antimicrobial activity of harvested cells was then measured qualitatively, by the double-agar layer assay. The results show that gastrointestinal conditions including acid and bile salt stresses do not have any effect on the ability of *L. lactis* UL719 to produce nisin. Indeed, all colonies isolated (about 20 colonies per compartments) showed that they were able to produce nisin and inhibit the sensitive strain of *Pediococcus acidilactici* UL5 at levels comparable to the original strain. Figure 4.3 shows an average diameter of inhibition zones of 18 ± 1 mm which is similar to that obtained for colonies that have not undergone gastrointestinal stress. Moreover, using the critical-dilution micro-method, a total activity of 2048 AU.mL^{-1} was obtained for all recovered colonies (data not shown).

4.5.3 Stability of nisin Z in dynamic gastro-intestinal conditions

Firstly, we have evaluated the GI stability of nisin produced during skim milk fermentation with *L. lactis* UL719. The antibacterial activity of nisin in fermented skim milk was monitored throughout the digestion with TIM-1. As shown in Figure 4.4, activity against the sensitive strain *P. acidilactici* UL5 was detected in the gastric compartment at different times (0, 35, 70 and 105 min) and is similar to the control that have not undergone gastrointestinal stress. However, no activity was detected in duodenal, jejunal and ileal compartments.

Secondly, we evaluated the antibacterial activity of purified nisin Z under GI conditions. This activity was determined by the agar diffusion test, by estimating its ability to inhibit the sensitive strain (Figure 4.5). The results are similar to those obtained with milk fermented by *L. lactis* UL719. Indeed, activity is detected in the gastric compartment, showing inhibition zones of 23 ± 1 mm against *P. acidilactici* UL5 that are identical to that obtained by nisin Z in skim milk and that has not undergone GI stress conditions. These results are confirmed by the critical-dilution micro-method. Indeed, an arbitrary activity of 4096 AU.mL^{-1} was obtained in the gastric compartment at different times (0, 35, 70 and 105 min) as well as in the positive control that has not undergone stressful condition of the GI tract (data not

shown). For the same reasons presented before, a total loss of the inhibitory activity of nisin Z was observed in the remaining compartments.

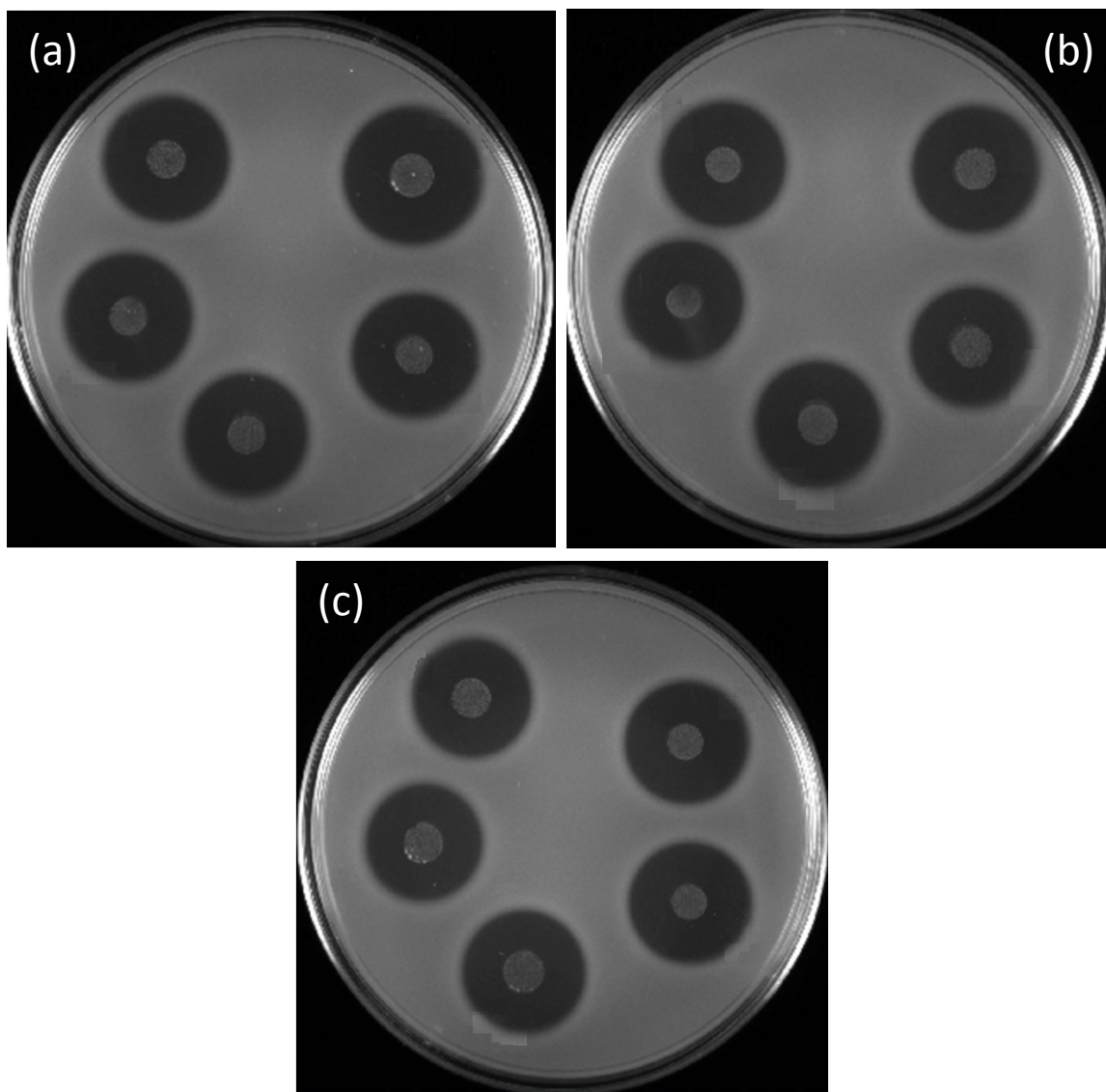


Figure 4.3 Double-agar assay showing inhibition of *Pediococcus acidilactici* UL5 by *Lactococcus lactis* UL719 recovered from different compartments during digestion of an overnight skim milk culture of *Lactococcus lactis* UL719. Lactococcal colonies were selected randomly from MRS agar medium from gastric compartment after 105 min of digestion (a), from duodenal compartment after 180 min of digestion (b) and from the exit of ileal compartment after 300 min of digestion (c).

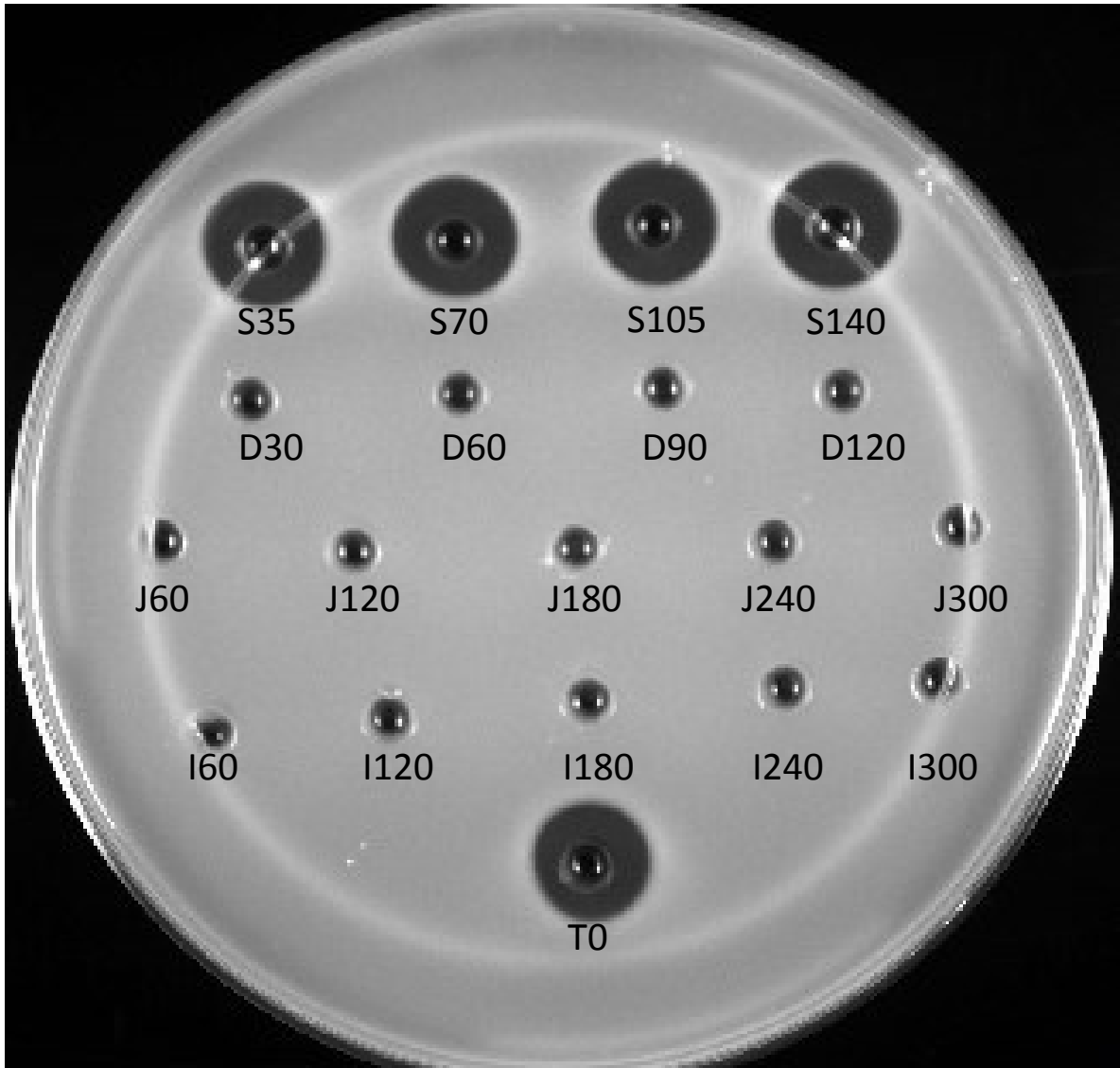


Figure 4.4 Agar diffusion test showing the biological activity of nisin Z against *Pediococcus acidilactici* UL5 for samples taken during digestion of skim milk sample fermented for an overnight with *Lactococcus lactis* UL719. S35-105 are from gastric compartment at 0, 35, 70 and 105 min of digestion. D30-120 are from the duodenal compartment at 30, 60, 90 and 120 min of digestion. J60-300 and I60-300 are from jejunal and ileal compartments at 60, 120, 180, 240 and 300 min of digestion. T0, 24 h skim milk culture of *Lactococcus lactis* UL719 not subjected to the TIM-1 treatment.

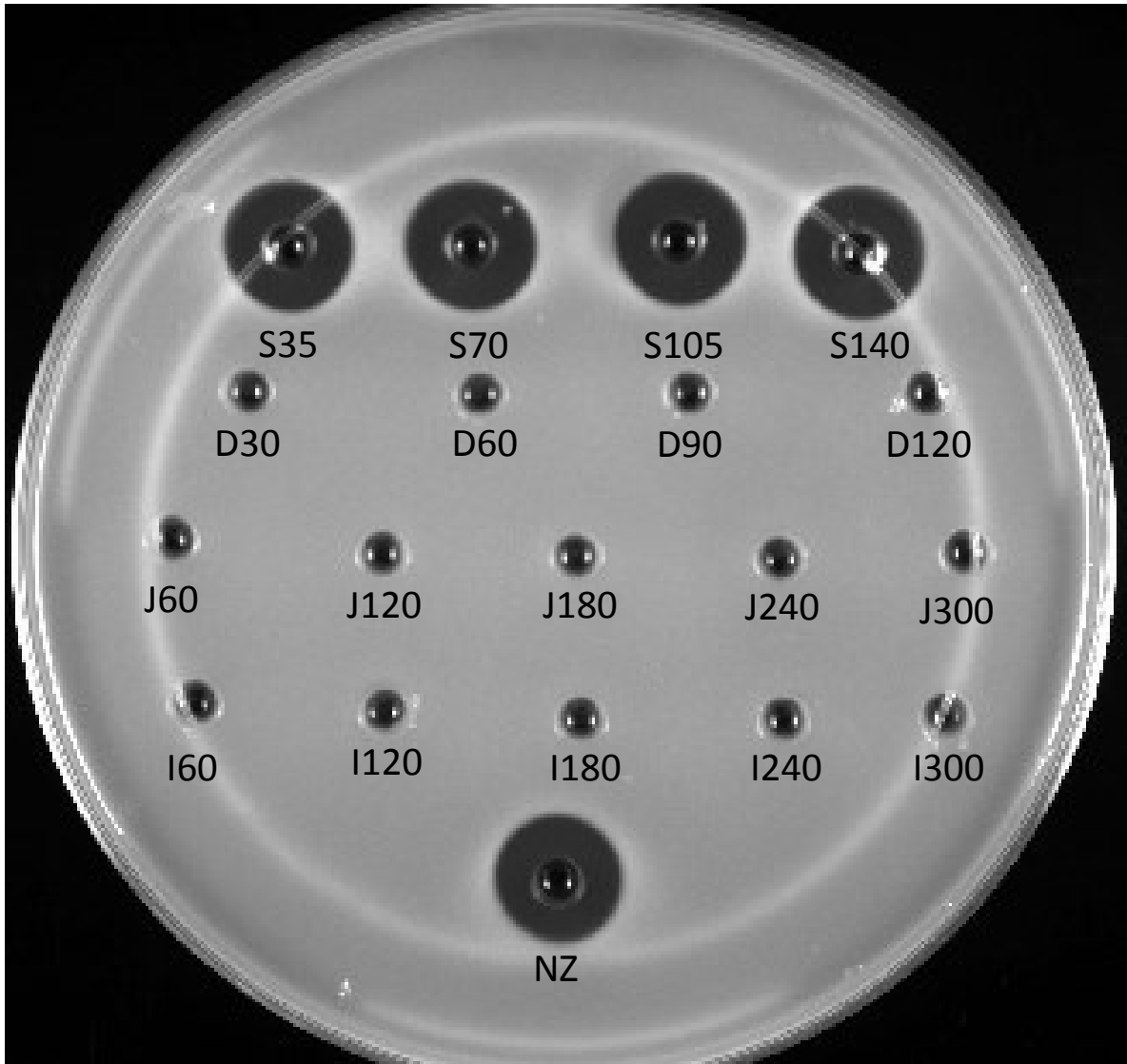


Figure 4.5 Agar diffusion test showing the biological activity of nisin Z against *Pediococcus acidilactici* UL5 for samples taken during digestion of purified nisin Z (10 mg per 300 mL of skim milk acidified at pH 5.3). S35-105 are from gastric compartment at 0, 35, 70 and 105 min of digestion. D30-120 are from the duodenal compartment at 30, 60, 90 and 120 min of digestion. J60-300 and I60-300 are from jejunal and ileal compartments at 60, 120, 180, 240 and 300 min of digestion. NZ, purified nisin Z in skim milk not subjected to the TIM-1 treatment.

4.6 Discussion

Studies on the survival of probiotic bacteria are important for the selection and development of new probiotic products or oral vaccines and also for a better understanding of the mechanisms involved in the beneficial effects of these microorganisms [351, 352]. In the present study, we investigated the viability of *L. lactis* UL719 and its ability to produce nisin Z after transit through the GIT using the TIM 1 dynamic model. This model permits an accurate and dynamic simulation of the physical and biochemical conditions influencing the survival of ingested microorganisms, such as pH, proteolytic enzymes, bile salts and peristaltic movements through the different parts of the GIT [348]. The TIM model offer several advantages over the other existing in vitro models notably accuracy, reproducibility, easy manipulation and the possibility of collecting samples at any level of the digestion tract and at any times during digestion. It also permits to avoid, ethical constraints related to the use of animal models and human [353]. The system has been validated by various studies including digestibility of nutrients, absorption of digestion products [348], availability for absorption of minerals [354], vitamins [355], food mutagens [356] and survival rate of microorganisms [352, 353].

In this study, we have shown that the viability of *L. lactis* UL719 is highly affected by pH in the gastric compartment. The initial drop in pH from 5.6 to 3.2 on the first 35 minutes does not cause any reduction in *L. lactis* UL719 count. However, from 70 min, where the pH reached a value of 2.3, a significant reduction in bacterial cell viability was observed. These results are similar to those obtained by Kheadr *et al.*, [344] for *Pediococcus acidilactici* UL5. They observed a significant reduction in viability when the pH reached 2 at 90 min. In addition, Millette *et al.*, [284] studied the resistance of *L. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33, *P. acidilactici* MM33A and *Lactobacillus rhamnosus* GG in simulated gastric fluid (SGF) for 30 min at different pH (1.5 to 3). They showed that all strains are sensitive to pH < 2 with a decimal reduction between 4 and 5 log UFC.mL⁻¹, excepting *L. lactis* MM19 which is strongly affected at a higher pH of 2.5 [284].

After acid stress, bacterial cells were subjected to bile salts, pancreatic and trypsin stresses encountered in the duodenum. Bile acids are amphipathic molecules synthesized from

cholesterol that are produced in the liver, stored inter digestively in the gall bladder and released into the duodenum where their main function is the breakdown of dietary fats. Bile also plays a vital role in the physiochemical defenses of the host through direct degradation of bacterial membranes [357]. A reduction of about 5 log UFC.mL⁻¹ in the viable count of *L. lactis* UL719 was observed after 180 min of digestion. This reduction may be associated to bile salts and the inability of the strain to degrade it. Similar reductions in the viability were obtained with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* [358], the bacteriocin-producer *Lactobacillus curvatus* [359], pediocin-producer *Pediococcus acidilactici* UL5 [344] and the nisin A producer *L. lactis* ATCC 11454 [345]. In addition, an *in vitro* study on the survival of *Lactococcus lactis* JIM4886 in digestive tract conditions has shown that *L. lactis* was very sensitive to duodenal conditions [360]. A survival rate of 0.01 % was then obtained [360]. Furthermore, Kim *et al.*, [361] have examined the effect of bile concentration in the range between 0 and 0.4 % on the *L. lactis* survival and they have reported inhibition effect of bile at concentration over 0.04 % and that all bacterial cells were completely killed at 0.2 % and higher [361]. Marteau *et al.*, [358] have reported similar conclusion about the effect of the concentration of bile on the viability of various probiotic bacteria. They have shown that reducing bile salts concentrations under those usually used in TIM-1 model resulted in twofold increase in viable counts of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. This is in agreement with survival data obtained in the human gastrointestinal tract with the same strains [362]. The viability of *L. lactis* UL719 in the jejunum and ileum is better than that observed in the duodenum. The count of viable cells of *L. lactis* UL719 in the jejunum and ileum during the first hour were 1.8×10^6 and 1.67×10^6 UFC.mL⁻¹, respectively, compared to 5.31×10^5 and 3.37×10^6 UFC.mL⁻¹ obtained at the end of digestion. As previously proposed by Kheadr *et al.*, [344], this high GI viability rate of *L. lactis* UL719 could be attributed to gradual reduction in bile salt concentration through the GI tract.

The survival rate of *L. lactis* UL719 was estimated at 0.45 %. This survival rate was similar to that obtained by Klijn *et al.*, [363] for *Lactococcus lactis* TC165.5 in the human gastrointestinal tract. A survival rate between 0.1 and 2 % was obtained in fecal material collected from volunteers after consumption of products containing *L. lactis* TC165.5 [363].

Moreover, the survival rate was higher than the one observed for the nisin A producing strain *L. lactis* ATCC 11454 [345]. This ability of *L. lactis* UL719 to survive under the human GIT was confirmed by Lakshminarayanan *et al.*, [304] who isolated a nisin Z producing strain from human intestinal microbiota.

Viable cells of *L. lactis* UL719 recovered from gastric, duodenal and at the end of ileal compartments were able to produce nisin Z and inhibit *P. acidilactici* UL5 at the same level as unstressed cells. Kheadr *et al.*, [344] have shown that few colonies of *P. acidilactici* UL5 recovered from the TIM model have lost their antimicrobial activity. This loss of activity could be associated to the lost of the plasmid carrying genes encoding for pediocin production [364]. This phenomenon was not observed with *L. lactis* UL719 probably because the nisin encoding gene is located on a transposon, which is much more stable [365].

When purified nisin Z was used, inhibition activity similar to that of the original nisin Z was observed through the gastric compartment. This result was in agreement with that obtained by Kheadr *et al.*, [344] for pediocin PA-1. These results confirm the high stability of most lactic acid bacteria bacteriocins to acidic pH in the range between 2 and 6 with the highest stability observed at pH 3.0 [366].

No antimicrobial activity of purified nisin Z was observed in the samples collected from the duodenal, jejunal and ileal compartments. This is probably due to the sensitivity of nisin to proteolytic enzymes encountered in the small intestine. This bacteriocin inactivation was already reported for pediocin [344] and nisin A [367]. Total degradation of purified lactacin 3147 by pancreatic α -chymotrypsin in porcine ileal digesta has also been reported by [368].

In the present study, we have shown the ability of *L. lactis* UL719 to survive under the human GIT, while maintaining its ability to produce nisin Z. Furthermore, recent results of our team have shown that *L. lactis* UL719 have the capacity to grow and produce bacteriocin in MacFarlane broth, a medium with a nutrient composition similar to that encountered in the human large intestine [369]. Future works should focus on the impact of *L. lactis* UL719 on the intestinal microbiota and its ability to inhibit pathogens under colonic conditions as well as the development of an encapsulation method of nisin to permit a released in the ileum or in the colon.

4.7 Acknowledgements

This work was supported by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

Chapitre 5 Compétitivité de *Lactococcus lactis* UL719 et la capacité de la nisine (Nisaplin[®]) à inhiber *Clostridium difficile* dans un modèle de colon humain.

On *Lactococcus lactis* UL719 competitiveness and nisin (Nisaplin[®]) capacity to inhibit *Clostridium difficile* in a model of human colon

Christophe Le Lay¹⁻², Benoit Fernandez¹, Riadh Hammami¹, Marc Ouellette² and Ismaïl Fliss¹

¹ STELA Dairy Research Center, Nutrition and Functional Foods Institute, Université Laval, Québec City, QC, Canada

² Centre de recherche en infectiologie de l'Université Laval, Axe Maladies infectieuses et immunitaires, Centre de recherche du CHU de Québec, Québec City (Québec), Canada; Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec City, QC, Canada.

Publié dans *Frontiers in microbiology*, doi : 10.3389/fmicb.2015.01020

5.1 Résumé

Clostridium difficile est le pathogène entérique le plus fréquemment identifié chez les patients souffrant de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques ou souffrant de colite pseudomembraneuse. Bien que le métronidazole et la vancomycine soient efficaces, on observe une augmentation du nombre d'échecs ou de récurrences des traitements contre *C. difficile*. L'usage de probiotiques, particulièrement l'usage de bactéries lactiques, a été récemment proposé à la communauté médicale comme une alternative. Le but de cette étude est d'évaluer la compétitivité d'un candidat probiotique, *Lactococcus lactis* UL719 productrice de nisine Z, et la capacité de la nisine (Nisaplin®) à inhiber *C. difficile* dans un modèle colique humain. La population bactérienne du modèle a été suivie par qPCR couplé avec un traitement au PMA. *L. lactis* UL719 est capable de survivre et de proliférer dans ses conditions simulant le côlon humain, sans altérer la composition du microbiote, mais n'est pas capable d'inhiber *C. difficile*. Avec un ajout de nisine à une concentration de 19 µM (5× la MIC), aucune inhibition de *C. difficile* n'est observée contrairement à un ajout de 76 µM (20× la MIC) qui est efficace pour inhiber *C. difficile*. La nisine (76 µM) cause quelques changements temporaires au niveau du microbiote, les bactéries à Gram positif sont les plus affectées. Ces résultats montrent la capacité de *L. lactis* UL719 à survivre dans des conditions simulant le côlon humain et l'efficacité de la nisine comme une alternative dans le traitement des infections à *C. difficile*.

Mots clés : *Clostridium difficile*; probiotique; *Lactococcus lactis* UL719; bactériocine; nisine; modèle colique

5.2 Abstract

Clostridium difficile is the most frequently identified enteric pathogen in patients with nosocomially acquired, antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. Although metronidazole and vancomycin were effective, an increasing number of treatment failures and recurrence of *C. difficile* infection are being reported. Use of probiotics, particularly metabolically active lactic acid bacteria, was recently proposed as an alternative for the medical community. The aim of this study was to assess a probiotic candidate, nisin Z-producer *Lactococcus lactis* UL719, competitiveness and nisin (Nisaplin®) capacity to inhibit *C. difficile* in a model of human colon. Bacterial populations were enumerated by qPCR coupled to PMA treatment. *L. lactis* UL719 was able to survive and proliferate under simulated human colon, did not alter microbiota composition, but failed to inhibit *C. difficile*. While a single dose of 19 µmol/L (5× the MIC) was not sufficient to inhibit *C. difficile*, nisin at 76 µmol/L (20× the MIC) was effective at killing the pathogen. Nisin (at 76 µmol/L) caused some temporary changes in the microbiota with Gram-positive bacteria being the mostly affected. These results highlight the capacity of *L. lactis* UL719 to survive under simulated human colon and the efficacy of nisin as an alternative in the treatment of *C. difficile* infections.

Keywords: *Clostridium difficile*; probiotic; *Lactococcus lactis* UL719; bacteriocin; nisin; colon model

5.3 Introduction

Clostridium difficile is a gram-positive anaerobic sporulating pathogen causing intestinal infections following disturbance of the human and animal gut microbiota, usually subsequent to an antibiotic therapy. *C. difficile* is now thought to be responsible for a wide range of diseases including acute diarrhea and pseudomembranous colitis, and could lead to colonic perforation and death if untreated [370]. Although metronidazole and vancomycin are well-established treatments for *C. difficile* infections (CDI) [291, 371], an increasing number of treatment failures with these antibiotics and recurrence of *C. difficile* infection are being reported, reviewed in Vardakas *et al.*, [191]. Vancomycin is also losing its attractiveness for CDI treatment with emergence of vancomycin-resistant enterococci and dissemination of antibiotic-resistance determinants within the hospital environment [372]. The emergence of *C. difficile* isolates with multiple-drug resistance is rarely explicitly mentioned [192, 313], but constitutes further a serious public health threat that urges the need of novel antimicrobial treatments.

Previously, a large number of clinical trials highlighted the positive role of probiotics in the treatment of diarrhea by either shortening its duration and/or preventing its complications in infants and young children, reviewed in Guandalini [373]. In instance, a yogurt containing a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lb. acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 was shown to be an effective method for reducing the incidence of antibiotic-associated diarrhea in children [374]. Moreover, different probiotics (*Saccharomyces boulardii*, *Lb. casei* DN114001, a mixture of *Lb. acidophilus* and *Bif. bifidum*, and a mixture of *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* and *Lb. rhamnosus*) significantly improved CDI prevention, reviewed in McFarland [375]. Although several meta-analyses pointed the positive effect of probiotics, their role in the prevention of CDI remains unclear. The health-promoting properties of probiotics are numerous and their effects on host include competition with pathogens for adhesion sites and nutrients, stimulation of immunity/immunomodulation, and production of inhibitory substances such as bacteriocins [238]. Bacteriocins have been suggested as promising alternative to conventional antibiotics [258, 282], and their production is being considered as a probiotic trait although not clearly demonstrated *in vivo* [339]. While several bacteriocins including nisin [17, 376], Microbisporicin [377], Lacticin

3147 [282] and thuricin CD [258] were shown effective against *C. difficile*, to date only nisin is approved by the American Food and Drug Administration, the World Health Organization and the European Union as natural food additive [378]. Nisin displays high antibacterial activity against multi-resistant *Streptococcus pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *C. difficile* [17, 343].

Previously, we have observed that potential probiotic *Lactococcus lactis* UL719, a nisin Z producer, was able to survive through the gastrointestinal tract (unpublished data). The strain *L. lactis* UL719 was able to grow and inhibit *Listeria* in a medium simulating the nutrient composition of the human colon [369]. The aim of this study was to evaluate the capacity of *L. lactis* UL719 and nisin (Nisaplin[®]) to inhibit *C. difficile* in a model of the colon mimicking physiological and microbiological conditions of the large intestine. In addition, impact of both strain and its bacteriocin on the gut microbiota composition were also investigated.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Bacterial strains and growth conditions

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719, a nisin Z-producer, was isolated from raw milk cheese [308, 379]. *Clostridium difficile* ATCC43255 was purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). *L. lactis* UL719 was reactivated in De Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) and cultivated for 24 hours at 30 °C. *C. difficile* was reactivated in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco laboratories, Sparks, MD, USA) supplemented with 0.05 % L-cysteine-HCl (Sigma chemicals). *C. difficile* culture was cultivated in an anaerobic chamber (Forma scientific anaerobic system Model 1025; Forma Scientific, Marietta, OH, USA) at 37 °C for 24 h. *Escherichia coli* ATCC25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC27275 were grown aerobically at 37 °C for 24 h in Brain Heart Infusion (BHI) and TSBYE, respectively. *Bifidobacterium. adolescentis* ATCC15703, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741, *Blautia coccoides* ATCC29236 and *C. leptum* ATCC29065 were respectively grown in MRS broth (0.05 % L-cysteine-HCl), BHI (0.05 % L-cysteine-HCl) and a modified chopped meat medium with maltose (ATCC medium 2751) under anaerobic conditions at 37 °C. All

bacterial strains were maintained in 20 % glycerol at -80 °C. Prior to each experiment, each bacterial strain was subcultured at least three times (inoculation at 1 %, v/v) at 24 h intervals.

5.4.2 Development of large intestine fermentation model

5.4.2.1 Feces collection and immobilization in gel beads

A fresh fecal sample was obtained from one 27 years old healthy donor who had not taken antibiotics for the previous 3 months. The collected fecal sample was used for immobilization following procedure described by Le Blay *et al.*, [105]. The entire process was completed aseptically under anaerobic conditions within 1 h after sample collection.

5.4.2.2 Nutritive medium

The culture medium used for colonic fermentation was the same as described by Macfarlane *et al.*, [107] with some modifications. Briefly, 0.5 mL of a vitamin solution (mg/L: pyridoxine–HCl 20; p-aminobenzoic acid 10; nicotinic acid 10; biotin 4; folic acid 4; vitamin B12 1; thiamine 8; riboflavin 10; menadione 2; vitamin K1 0.005; pantothenate 20) described by Gibson and Wang [380] was added to each liter of the culture medium. The vitamin solution was sterilized by filtration (0.2 µm, VWR) and added to the autoclaved medium (15 min, 121 °C) after cooling at room temperature.

5.4.2.3 Experimental setup and sampling

The colonic fermentation was based on the model described by Cinquin *et al.*, [96]. A single-stage reactor (Bioflo III, New Brunswick Scientific Inc., Edison, NJ, USA) with 1 L working volume containing 30 % (v/v) of freshly prepared beads was used to mimic the microbial ecosystem of adult distal colon. The colonization of beads with fecal microbiota was carried out during two days, and the nutritive medium was aseptically replaced by fresh culture medium every 12 h. pH (6.2) and anaerobic and temperature (37 °C) conditions were maintained during the whole fermentation by addition of 5 M NaOH and a continuous flow of pure CO₂ in the headspace. The continuous fermentation was carried out in the same reactor connected to a stirred feedstock vessel containing the sterile culture medium at 4 °C

under a CO₂ atmosphere and to an effluent-receiving vessel. Feed flow rate was adjusted to 83.3 mL/h to mimic a mean retention time of 12 h encountered in adult distal colon.

The fermentation process was carried out for a total of 82 days and microbiota was stabilized two weeks before challenging tests. First, a cell suspension of *L. lactis* UL719 (at final concentration 10⁹ CFU/mL in the reactor) was added twice to the reactor (day 17 and day 22) (Figure 5.1). Then, nisin A (Nisaplin[®], Danisco, Copenhagen, Denmark) was added to the reactor at 5× (at day 27 and 32) and 20× (at day 37 and 42) the MIC (3.8 μmol/L vs *C. difficile*) to measure the impact of high doses of nisin on the intestinal flora. Next, challenges with *C. difficile* ATCC43255 (at a final concentration of 5×10⁶ CFU/mL in the reactor) in absence (day 47 and 52) or in presence of *L. lactis* (added at a final concentration of 10⁹ CFU/mL in the reactor; day 57 and 62) or in presence of different concentrations of nisin A (5× [day 67 and 72] or 20× [day 77 and 82] the MIC) were performed. Samples were collected for bacterial enumeration by qPCR. After each addition, samples were hourly taken during first 4 h and at 8 h.

5.4.3 Microbiota composition analysis using q-PCR coupled to PMA treatment

Standard curve for the qPCR quantification was done using the following strains: *E. coli* ATCC 25922, *Bif. adolescentis* ATCC15703, *Bac. thetaiotaomicron* ATCC29741, *C. leptum* ATCC29065, *Bl. coccoides* ATCC29236 and *E. faecalis* ATCC27275. Samples were collected from the reactor and treated with propidium monoazide (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) prior enumeration of viable bacteria, as described in Fernandez *et al.*, [381]. The DNA from fecal and fermentation samples were then extracted following the protocol of Ahlroos and Tynkkynen [382] using the Wizard[®] genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) with some modifications [381]. Real-time PCR was carried out on an ABI 7500 real-time PCR system (Applied biosystem Streetsville, ON, Canada) with the iTaq[™] Universal SYBR[®] Green supermix (Biorad, Oakville, ON, Canada) in 96-well plates following method described in Fernandez *et al.*, [381]. Primers used in this study are summarized in Table 5.1. Each sample was done in triplicate.

5.4.4 Analyses of metabolites

Short-chain fatty acids (SCFA: acetate, propionate, butyrate and valerate) and isoacids (isobutyrate and isovalerate) were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis (Waters, Milford, MA) equipped with an Ion 300 column (Transgenomic, San Jose, CA, USA), a differential refractometer (Model R410, Waters) as previously described by Cinquin *et al.*, [96]. The analysis was performed at a flow rate of 0.4 mL/min at 37 °C, with an injection volume of 100 µL. Each analysis was done in duplicate. The mean metabolite concentrations were expressed in mmol/L.

5.4.5 Statistical analysis

Data are presented as means \pm SD. Cell counts values were log₁₀-transformed and analyzed for repeated measures using the PROC MIXED procedure of SAS v9.2 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The statistical differences in metabolites contents between treatments were evaluated using a one-way ANOVA *t*-test. The level of significance was $P \leq 0.05$.

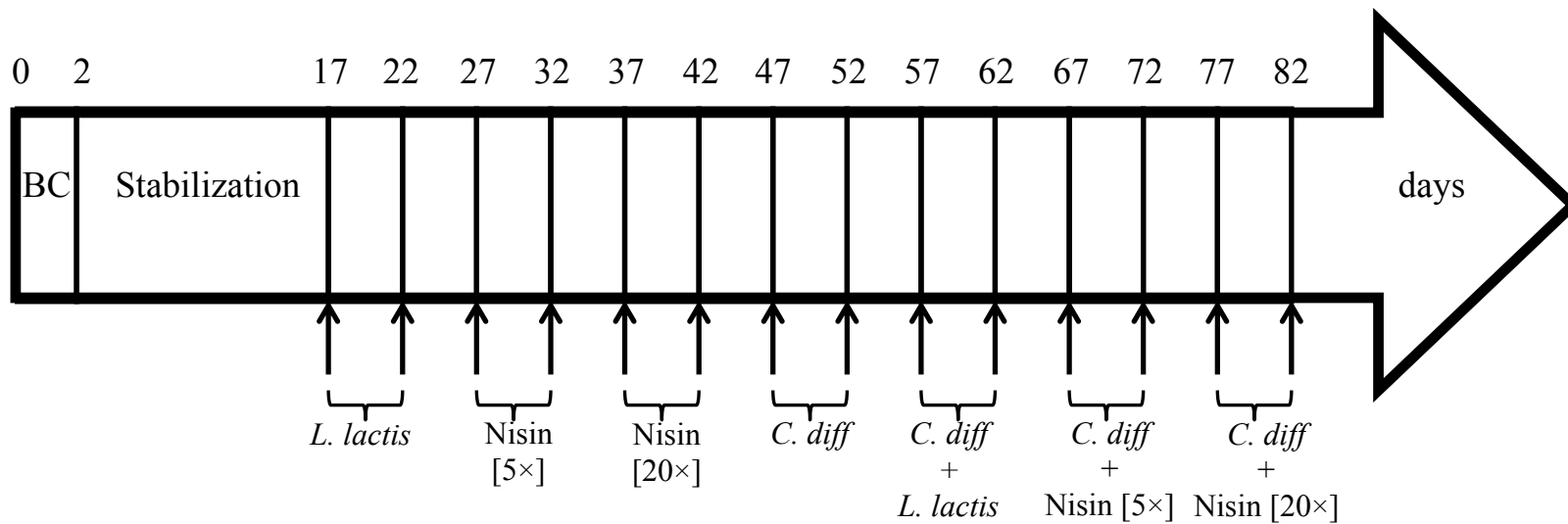


Figure 5.1 Time schedule of continuous intestinal fermentation during the different treatment periods. BC, bead colonization. *Lactococcus lactis* UL719 was added at final concentration of (10^9 CFU/mL) in the reactor. *C. difficile* ATCC43255 was added at a final concentration of $5 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$.

Table 5.1 Primers used for the detection of different bacterial groups in inoculum or fermentation samples by real-time qPCR analysis.

Target organisms	Gene	Sequence 5'-3'	Reference
All bacteria	16S	f: TCCTACGGGAGGCAGCAGT	[383]
		r: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
<i>Ruminococcaceae</i> (<i>Clostridium leptum</i>)	16S	f: GCACAAGCAGTGGAGT	[384]
		r: CTTCTCCGTTTTGTCAA	
<i>Lachnospiraceae</i> (<i>Blautia coccoides</i>)	16S	f: AAATCACGGTACCTGACTAA	[385]
		r: CTTTGAGTTCATTCTTGCGAA	
<i>Bifidobacteria spp.</i>	16S	f: TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG	[386]
		r: CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	16S	f: CATGCCGCGTGTATGAAGAA	[387]
		r: CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	
<i>Bacteroidetes</i>	16S	f: GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	[386]
		r: CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC	
<i>Lactobacillaceae/Leuconostocaceae</i> group	16S	f: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	[386]
		r: CGCCACTGGTGTTCYTCCATATA	
<i>Clostridium difficile</i>	tcdA	f: CTCCTGGACCACTTAACTTATTGTG	This study
		r: GCTACCGCAGAAACTCTATGTTTT	
<i>Lactococcus lactis</i> UL719	nisI	f: CTGAAGTACGTGTGTTTGATTTCAGTTAG	[388]
		r: TCGCCATAATCCCATTCCGTC	

5.5 Results

5.5.1 Microbiota composition during stabilization period

Bacterial populations enumerated by qPCR coupled to PMA treatment in the fecal inoculum and effluent samples at the end of stabilization period are summarized in Table 5.2. The fecal inoculum presented a total bacterial cell counts of $11.84 \pm 0.04 \log_{10}$ CFU/g, which was dominated by *Bacteroidetes* ($10.85 \pm 0.02 \log_{10}$ CFU/g), clostridia ($10.55 \pm 0.02 \log_{10}$ CFU/g) and bifidobacteria ($10.16 \pm 0.15 \log_{10}$ CFU/g). At the end of the stabilization period (16 days) under simulated colon conditions, the microbiota population reached a pseudo steady state in which a slight change was observed in the microbial balance, compared to the initial fecal inoculum. The microbiota decreased by $-0.7 \log_{10}$ CFU/mL at this stage and was dominated by *Bacteroidetes* group with $10.52 \pm 0.08 \log_{10}$ CFU/mL. While *Enterobacteriaceae* group increased by $1.49 \log_{10}$ and reached $8.73 \pm 0.01 \log_{10}$ CFU/mL, bifidobacteria and *Lactobacillaceae/Leuconostocaceae* group populations dropped to 6.14 ± 0.08 and $3.82 \pm 0.14 \log_{10}$ CFU/mL, respectively. Nevertheless, the obtained results are in accordance to those previously reported for colonic fermentation models [105, 389-391].

5.5.2 *Lactococcus lactis* UL719 alone or in presence of *C. difficile* ATCC43255 have no perturbing impact on intestinal microbiota under simulated colonic conditions

After the stabilization period, *L. lactis* UL719, *C. difficile* ATCC43255 and their combination were successively added to the bioreactor and the microbiota populations were monitored by qPCR (Table 5.3). Interestingly, the addition of *L. lactis* UL719 at 1×10^9 CFU/mL to the bioreactor, did not induce any significant change neither in the intestinal microbiota composition nor in metabolites production (Table 5.4). Since the last addition of *L. lactis* UL719 to the reactor, the strain was detected at about $0.1-1 \times 10^9$ CFU/mL during the remaining 20 days of fermentation (Figure 5.2). While the infection of the bioreactor with 5×10^6 CFU/mL of *C. difficile* did not affect the microbiota composition, a slight but significant decrease ($p < 0.05$) of acetate and butyrate was detected (from 76.24 to 72.59 mmol/L and from 32.13 to 29.54 mmol/L, respectively) (Table 5.4). Simultaneous addition of *C. difficile* and *L. lactis* UL719 had no impact on the microbiota

cell counts but a significant decrease ($p < 0.05$) of butyrate (from 32.13 to 28.40 mmol/L). Under these conditions, *L. lactis* has no inhibitory effect on *C. difficile* (Figure 5.3).

5.5.3 A nisin concentration of 20× the MIC is required to effective inhibition of *C. difficile* ATCC43255 in a model of human colon

The microbiota was challenged by 5× and 20× the MIC vs *C. difficile* ATCC43255. Nisin at 5× the MIC did not alter the microbiota which remained stable (data not shown) although minor variations in the metabolite production profile (Table 5.4). At a nisin concentration of 20× the MIC, total microbiota significantly decreased by 0.7 log₁₀ ($p < 0.008$), as shown in Figure 5.4. Gram-positive bacteria were affected by this higher amount of nisin, with *Ruminococcaceae* group being the mostly altered (minus 3.7 log₁₀) after 24 h. In a lesser extent, a reduction of 1.5 log₁₀, 1.3 log₁₀ and 1 log₁₀ were recorded for *Lachnospiraceae* group, *Lactobacillaceae/Leuconostocaceae* group and bifidobacteria, respectively. After 24 h of nisin administration, all bacterial populations recovered their initial counts except *Ruminococcaceae* group which dropped to its minimum counts. While acetate and butyrate significantly decreased ($p < 0.05$) from 76.24 and 32.13 mmol/L to 69.12 and 26.29 mmol/L, propionate production increased by 13 % (Table 5.4). Besides, a nisin concentration of 5× did not inhibit *C. difficile*, which counts remained close to control (*C. difficile* alone) (Figure 5.3). Conversely, nisin at 20× was effective at inhibiting *C. difficile* with a significant reduction ($p < 0.001$) of 2.3 log₁₀ at 1 h that lasted for 8 h (Figure 5.3). *C. difficile* was not detected after 24 h in this model (data not shown).

Table 5.2 Bacterial cell counts in the fecal inoculum and during the fermentation at the end of the stabilization period of the continuous culture measured by qPCR.

Bacterial population	Feces ^a	Inoculum ^b	End of stabilization ^c	CFS ^d
		qPCR	qPCR	
Total bacteria	10.6-11.6	10.84 ± 0.04	11.11 ± 0.17	8.9-10.2
<i>Lachnospiraceae</i> group	9.9-11.1	9.46 ± 0.02	8.14 ± 0.05	7-9.5
<i>Ruminococcaceae</i> group		10.52 ± 0.02	9.43 ± 0.01	
<i>Bacteroidetes</i>	9.2-10.3	10.85 ± 0.02	10.52 ± 0.08	6.8-10.1
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7.2-10.2	10.16 ± 0.15	6.14 ± 0.08	6.0-9.0
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	8.0-9.8	7.24 ± 0.53	8.73 ± 0.01	7.3-9.2
<i>Lactobacillaceae/Leuconostocaceae</i> group	8.6-9.5	6.98 ± 0.19	3.82 ± 0.14	<6.0-8.3

^aFecal populations (log₁₀ CFU/g) of healthy adults reported in various studies and measured by FISH ([392, 393])

^bBacterial concentrations (log₁₀ CFU/g of feces)

^cBacterial concentrations (log₁₀ CFU/mL)

^dBacterial concentrations (log₁₀ CFU/mL) reported for *in vitro* continuous fermentation samples (CFS) and measured by FISH [105, 389-391]

Table 5.3 Impact of *Lactococcus lactis* UL719 (10^9 CFU/mL) and/or *C. difficile* ATCC43255 (5×10^6 CFU/mL) addition on the microbiota.

Bacterial population	<i>L. lactis</i> UL719		<i>C. difficile</i>		<i>L. lactis</i> UL719 + <i>C. difficile</i>	
	0	8 h	0	8 h	0	8 h
Total bacteria	10.87 ± 0.13	10.80 ± 0.19	10.80 ± 0.08	10.71 ± 0.04	10.40 ± 0.31	10.66 ± 0.19
<i>Lachnospiraceae</i> group	8.05 ± 0.25	8.04 ± 0.28	8.06 ± 0.09	8.01 ± 0.05	7.42 ± 0.24	7.76 ± 0.23
<i>Ruminococcaceae</i> group	9.36 ± 0.10	9.32 ± 0.17	9.29 ± 0.03	9.25 ± 0.02	8.93 ± 0.21	9.23 ± 0.09
<i>Bacteroidetes</i>	10.51 ± 0.04	10.32 ± 0.11	10.31 ± 0.16	10.06 ± 0.13	9.82 ± 0.60	10.18 ± 0.33
Bifidobacteria	6.35 ± 0.17	6.13 ± 0.79	5.26 ± 0.84	5.18 ± 0.81	5.56 ± 0.69	5.61 ± 0.07
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.95 ± 0.10	8.81 ± 0.22	9.49 ± 0.08	9.28 ± 0.04	9.20 ± 0.31	9.23 ± 0.25
<i>Lactobacillaceae/Leuconostocaceae</i> group	3.69 ± 0.15	3.57 ± 0.47	5.75 ± 0.44	5.46 ± 0.36	5.43 ± 0.28	5.59 ± 0.32

Data are mean ± standard deviation of two biological replicates and three technical replicates. Values are not significantly different by the student's test ($P < 0.05$)

Table 5.4 Concentration of short chain fatty acids (SFCA) in effluent samples at 4 h following various treatments.

Metabolites	Treatments											
	End of stabilization		<i>L. lactis</i> UL719		<i>C. difficile</i>		<i>L. lactis</i> UL719 + <i>C. difficile</i>		Nisin 5×		Nisin 20×	
	(mmol/L)	(%)	(mmol/L)	(%)	(mmol/L)	(%)	(mmol/L)	(%)	(mmol/L)	(%)	(mmol/L)	(%)
Acetate	76.24 ± 0.15 ^a	44.67	75.34 ± 1.23 ^a	43.94	72.59 ± 1.73 ^b	44.62	76.30 ± 0.45 ^a	45.18	75.14 ± 0.67 ^a	44.47	69.12 ± 2.44 ^c	43.86
Propionate	43.09 ± 0.01 ^c	25.25	43.29 ± 0.26 ^c	25.25	41.68 ± 2.27 ^c	25.62	43.53 ± 2.42 ^c	25.78	45.54 ± 1.51 ^b	26.95	48.69 ± 0.33 ^a	30.89
Butyrate	32.13 ± 0.01 ^a	18.82	32.59 ± 0.26 ^a	19.01	29.54 ± 0.70 ^c	18.16	28.40 ± 0.44 ^c	16.82	30.83 ± 0.30 ^b	18.25	26.29 ± 0.75 ^d	16.68
Isobutyrate	5.23 ± 0.47 ^b	3.06	5.75 ± 0.24 ^a	3.35	5.44 ± 0.30 ^{ab}	3.334	5.61 ± 0.08 ^{ab}	3.32	4.47 ± 0.42 ^c	2.65	4.44 ± 0.19 ^c	2.82
Valerate	5.00 ± 0.08 ^a	2.93	4.92 ± 0.24 ^a	2.87	4.64 ± 0.68 ^a	2.85	5.89 ± 0.15 ^a	3.49	4.84 ± 0.59 ^a	2.86	2.05 ± 2.37 ^b	1.30
Isovalerate	8.99 ± 0.39 ^b	5.27	9.56 ± 0.18 ^a	5.58	8.81 ± 0.31 ^b	5.41	9.13 ± 0.15 ^{ab}	5.41	8.15 ± 0.49 ^c	4.82	7.02 ± 0.30 ^d	4.45
<i>Total SCFA</i>	170.68		171.45		162.70		168.86		168.97		157.61	

Data are mean ± standard deviation of two biological replicates and three technical replicates. Values with different letters in the same row are significantly different by the student's test (P<0.05).

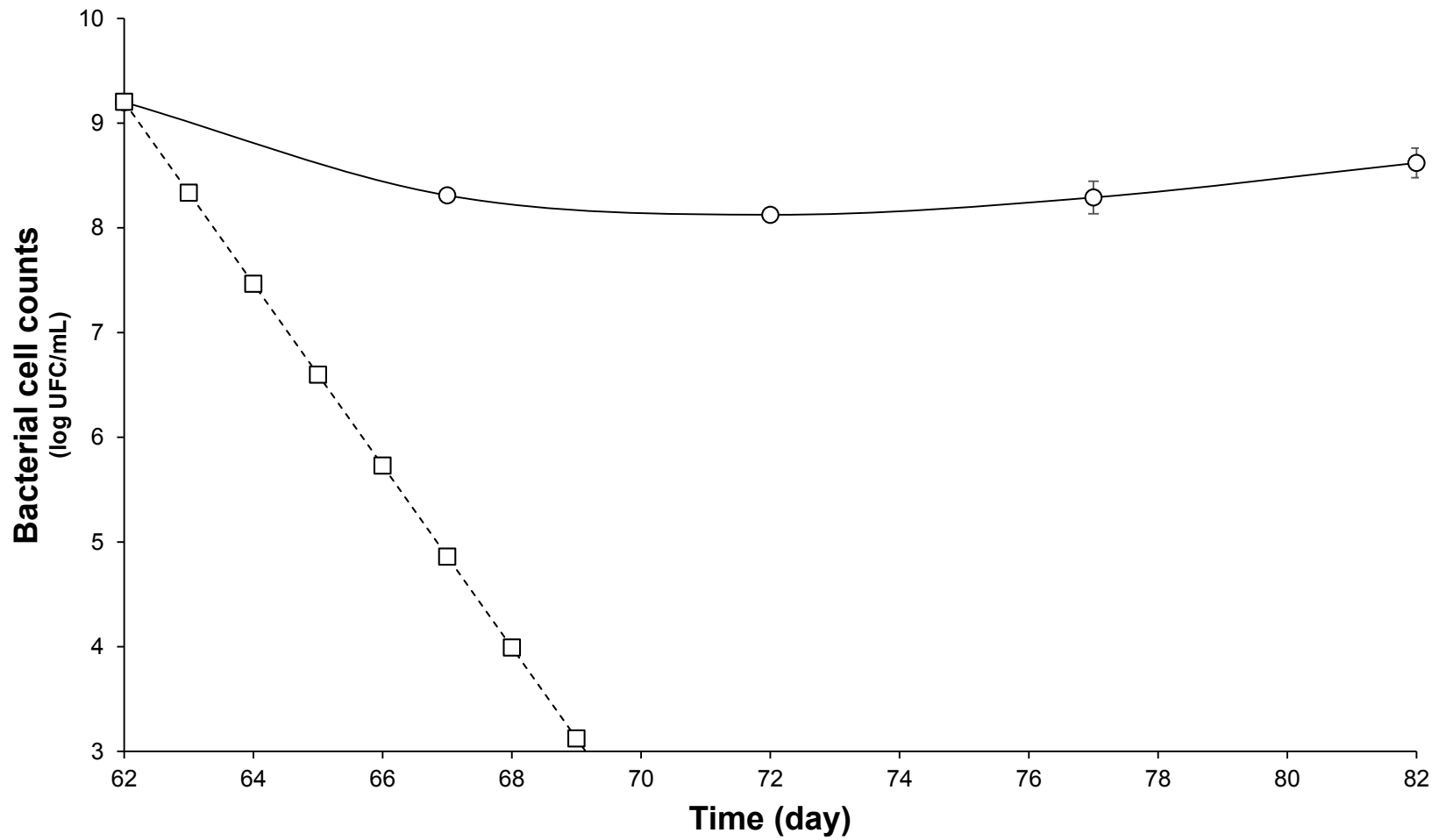


Figure 5.2 Survival of *Lactococcus lactis* UL719 after its last addition (day 62) in a human colon model. *L. lactis* UL719 (circle); theoretical washout (square).

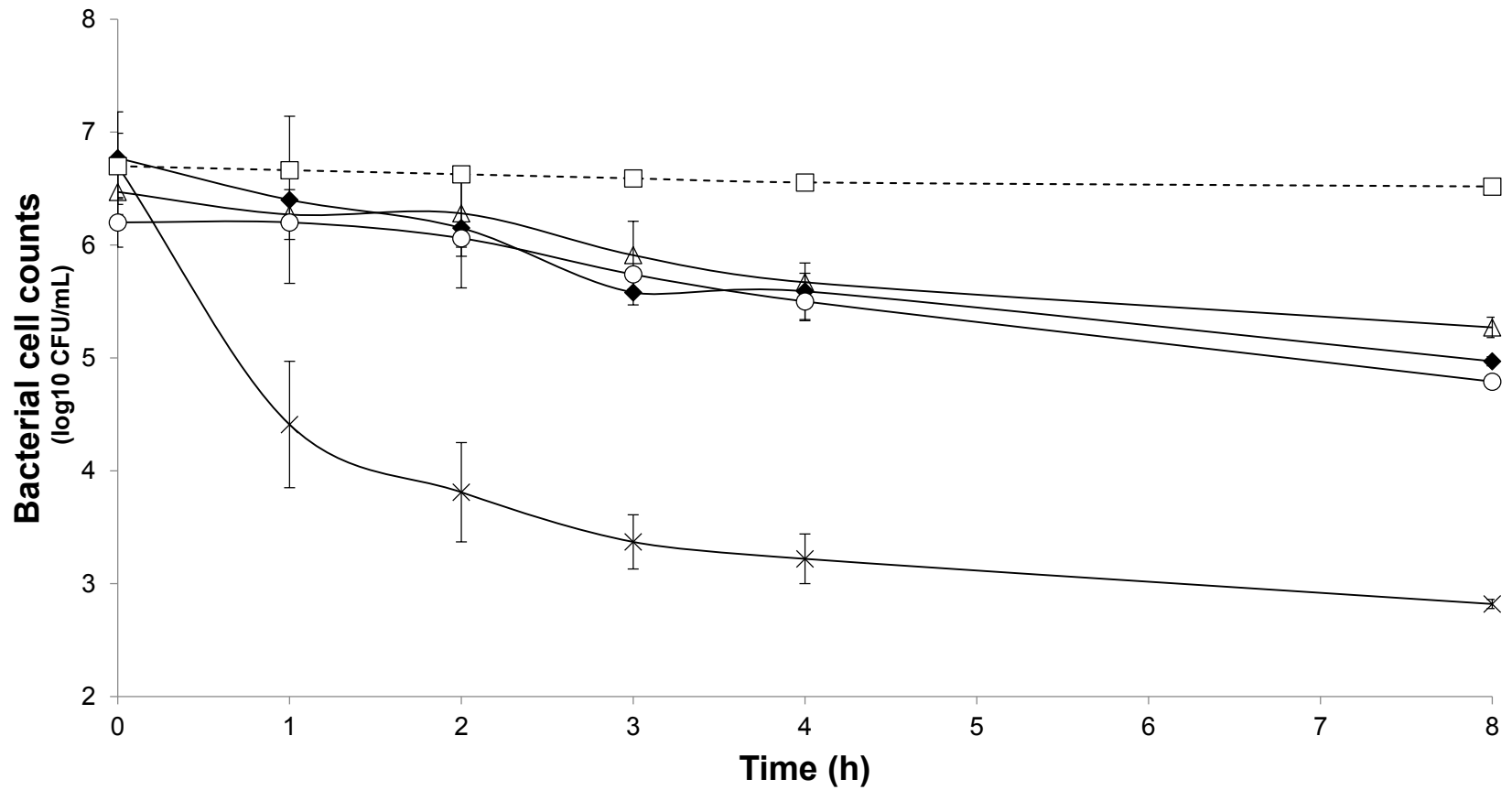


Figure 5.3 Inhibitory activity of nisin at 5× and 20× the MIC (3.8 μmol/L) and *Lactococcus lactis* UL719 (10⁹ UFC/mL) against *Clostridium difficile* ATCC43255 in a human colon model. *C. difficile* alone (black diamond); *C. difficile* plus nisin 5× (white triangle); *C. difficile* plus nisin 20× (cross); *C. difficile* plus *L. lactis* UL719 (white circle); theoretical washout (white square).

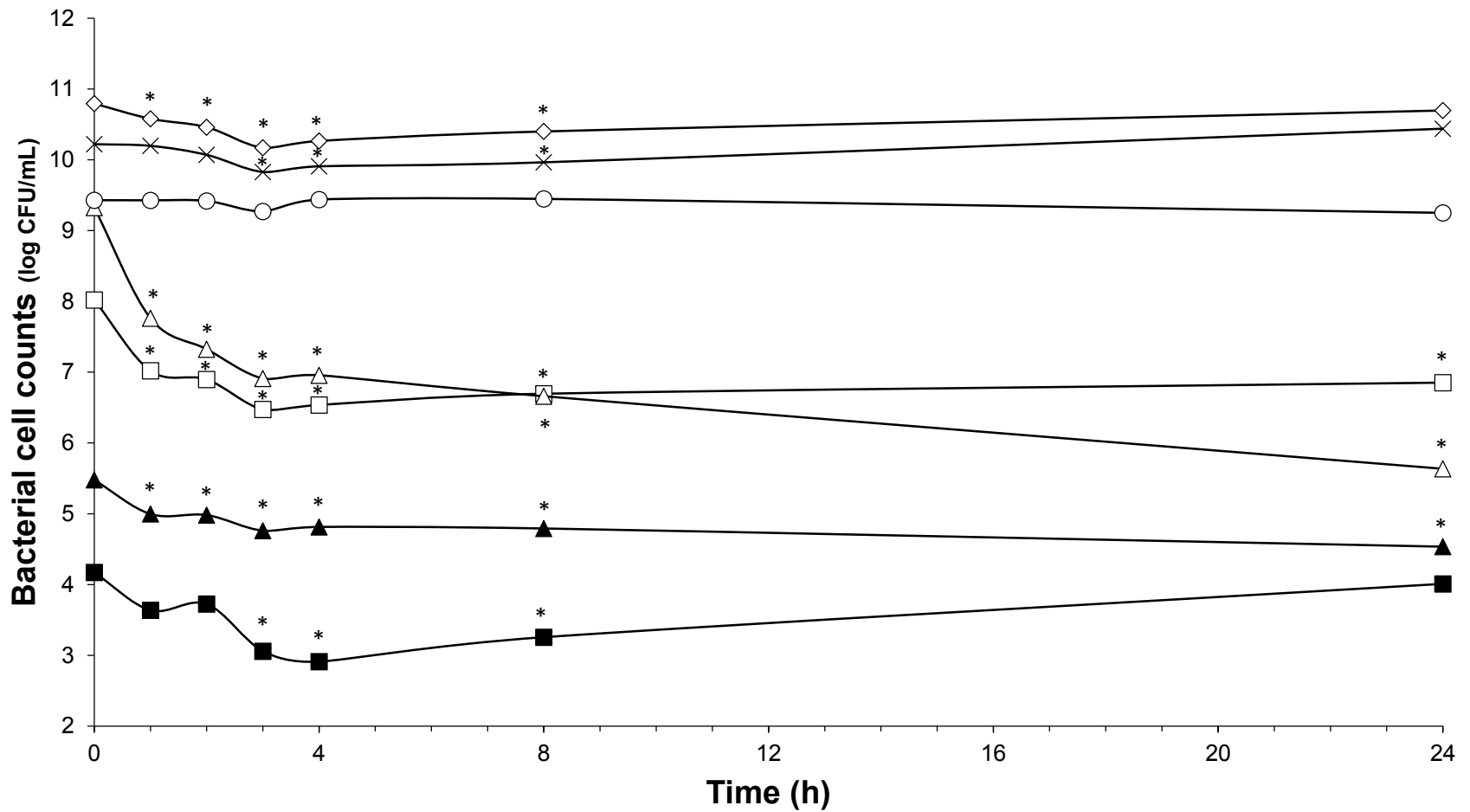


Figure 5.4 Impact of nisin addition at 76 $\mu\text{mol/L}$ ($20\times$ the MIC vs *Clostridium difficile* ATCC43255) on microbiota population enumerated by qPCR. Total bacteria (white diamond); *Lachnospiraceae* group. (white square); *Ruminococcaceae* group. (white triangle); *Bacteroidetes* (cross); Bifidobacteria (black triangle); *Enterobacteriaceae* (white circle); *Lactobacillaceae/Leuconostocaceae* group. (black square); Values with asterisk are significantly different ($P<0.05$).

5.6 Discussion

Previously, we have demonstrated the nisin efficacy against several clinical isolates of *C. difficile* vegetative cells and spores [376]. In addition, we have observed that *L. lactis* UL719, a nisin Z producer, was able to survive these GIT stressful conditions, to keep ability to produce its bacteriocin, and to reach the colon in large enough numbers ($>10^8$ CFU) to comply with the recommended daily dose of 10^8 - 10^9 cells delivery to exert a beneficial effect on the host (unpublished data). The aim of this study was to assess *Lactococcus lactis* UL719 competitiveness and its bacteriocin capacity to inhibit *C. difficile* ATCC43255 in a model of human colon. In this study, *L. lactis* UL719 at 10^9 CFU/mL did not induce any significant change neither in the intestinal microbiota composition nor in metabolites production. The strain was monitored by quantification of *nisI* gene by PMA-qPCR, and found able to survive and proliferate up to 10^8 CFU/mL in our colonic model during the 82 days of fermentation (Figure 5.2). Unlikely, *L. lactis* DPC6520 was shown more susceptible to GIT conditions, which cell counts were reduced by 10 000-fold 24 h after its inoculation into a colon model [285]. Likewise, a 19 $\mu\text{mol/L}$ concentration of nisin (corresponding to $5\times$ the MIC vs *C. difficile* ATCC43255) did not alter microbiota levels. At a higher concentration of 76 $\mu\text{mol/L}$ ($20\times$), Gram positive bacteria were affected and *Ruminococcaceae* group was the mostly altered (minus 3.7 \log_{10}), while increase in Gram negative population (*Bacteroidetes* and *Enterobacteriaceae*) were observed. Nevertheless, the initial bacterial balance was quickly restored within 24 h after the addition of $20\times$ nisin. Previously, we have shown *in vitro* the sensitivity of colonic Gram positive bacteria such as *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456, *Lactobacillus fermentum* ETHZ, *Clostridium clostridioforme* DSM933, *Eubacterium biforme* DSM3989 to nisin [17]. Recently, Rea *et al.*, [92] reported that lactacin 3147 induce similar variations in microbiota composition, with a decrease in Firmicutes abundance in favor of *Proteobacteria*. Broad-spectrum antibiotics like vancomycin and metronidazole seems to induce also decrease of Firmicutes and an increase in *Enterobacteriaceae* and *Proteobacteria* [92, 394]. More recently, thuricin CD, a narrow spectrum bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*, was used in the distal colon model and had no significant impact on the composition of the microbiota [92].

Although its capacity to survive colonic conditions, *L. lactis* UL719 had no significant effect on *C. difficile*. Similar results were previously reported with *L. lactis* DPC6520 (a lactacin 3147 producer) and *L. lactis* DPC6519 (lactacin non-producer) in an *ex vivo* human colonic model [285]. Although *L. lactis* UL719 is able to produce nisin in a Macfarlane medium simulating the nutrient composition of the colon [369], the lack of effectiveness observed here is likely due to no or a low production of nisin, not sufficient to inhibit *C. difficile*. Conversely, *Lb. salivarius* UCC118 has demonstrated its capacity to produce the Abp118 bacteriocin *in vivo* and to protect mice against infection with the invasive foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. This protection was related to bacteriocin production, and mutant of *Lb. salivarius* UCC118 lacking the bacteriocin gene failed to protect mice against infection [283]. Some similar results were obtained with human *L. lactis* and *Pediococcus acidilactici* nisin- and pediocin-producing strains that were able to reduce vancomycin-resistant enterococci intestinal colonization in a mouse model [284].

Although *L. lactis* UL719 had no significant effect on *C. difficile* in this model of human colon, addition of nisin at 76 $\mu\text{mol/L}$ induced a significant reduction of *C. difficile*. At lower concentration of nisin (19 $\mu\text{mol/L}$), we did not show any significant effect on *C. difficile*, its rapid adsorption on the surface of the colonic microbiota or its inactivation due to enzymatic activities (proteolysis mainly) could explain this lack of activity [285]. Rea *et al.*, [92] have reported on the effectiveness of other bacteriocins such as lactacin 3147 and thuricin CD against *C. difficile* in a distal colon model. Lactacin 3147 (270 $\mu\text{mol/L}$) and thuricin CD (90 $\mu\text{mol/L}$) affected the viability of *C. difficile* (10^6 CFU/mL) with a loss of detection after 12 h and three \log_{10} reduction after 24 h, respectively [92]. After respective addition of lactacin 3147 (270 $\mu\text{mol/L}$) and thuricin CD (90 $\mu\text{mol/L}$), authors have shown a CFU reduction of 4 \log_{10} and 1.2 \log_{10} , but lactacin at 90 $\mu\text{mol/L}$ had no significant effect on the *C. difficile* viability [92]. In this study, nisin was as effective as lactacin 3147 and more efficient than thuricin CD with a CFU reduction of 3.23 \log_{10} with nisin (76 $\mu\text{mol/L}$) compared to initial time. Besides, three times addition of vancomycin (90 $\mu\text{mol/L}$) or metronidazole (90 $\mu\text{mol/L}$) is required to induce a significant effect on *C. difficile* after 24 h [92]. A single dose of nisin (76 $\mu\text{mol/L}$) was as effective as antibiotics traditionally used to treat *C. difficile* infections.

With increase of failures and recurrences in the treatment of *C. difficile* infections, development of alternative treatments has become necessary. In recent years, use of probiotic bacteria producing antimicrobial molecules (such as bacteriocins) constitute a promising alternative for prevention and treatment of *C. difficile* related diseases. In the study, we have shown that nisin-producer *L. lactis* UL719 was able to survive and proliferate in the human colon model. Although *L. lactis* UL719 failed to inhibit *C. difficile* in this model, *L. lactis* UL 719 had not affected the microbiota. Others studies aiming to increase competitiveness and nisin production will be necessary and could include the addition of prebiotics or carbohydrate which stimulate nisin production. Nisin causes some temporary changes in the microbiota but is effective at killing *C. difficile* in the human colon model. Nevertheless, the effect of NaCl contained in Nisaplin[®] could promote the efficiency of nisin.

5.7 Acknowledgments

This work was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fond de Recherche Nature et Technologies from the province of Quebec (FQRNT).

Conclusion générale et perspectives

L'infection à *Clostridium difficile* est un problème de santé publique à l'incidence croissante dans de nombreux pays. Il est clairement identifié que l'usage d'antibiotiques entraîne une perturbation du microbiote intestinal et permet ainsi à des microorganismes opportunistes, comme *C. difficile* possédant certaines résistances aux antibiotiques, de proliférer et d'engendrer l'infection. Cette infection est traitée uniquement par la prise de métronidazole et de vancomycine. Toutefois ces traitements commencent à montrer leurs limites. En effet, des échecs cliniques ont été observés avec la métronidazole et la vancomycine et des souches de *C. difficile* ont montré une diminution de la sensibilité à la vancomycine et une résistance au métronidazole [192, 193]. Face à ce constat, il est nécessaire de rechercher des alternatives dans le traitement de cette infection. Parmi les alternatives on y retrouve l'usage de probiotique.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité du candidat probiotique *L. lactis* UL719 producteur de nisine à survivre au niveau du tractus gastro-intestinal et à inhiber *Clostridium difficile* via sa production de bactériocine. Au cours de cette étude, la capacité de deux formes de nisine (A et Z) à inhiber des souches cliniques de *C. difficile* a été démontrée. Les résultats obtenus montrent que les deux formes de nisine avaient une activité inhibitrice souche-dépendante (Chapitre 3). Les souches les plus sensibles ont une concentration minimale d'inhibition (CMI) de 0,8 µg/mL, tandis que les souches les moins sensibles ont une CMI de 51,2 µg/mL. En plus, il semble que les souches de *C. difficile* étudiées aient une plus grande sensibilité à la nisine A qu'à la nisine Z. Cette différence de sensibilité peut être expliquée par leur différence dans leur composition en acides aminés [105, 274]. Suite à une exposition à la nisine A ou à la nisine Z, certaines souches de *C. difficile* ont été observées par microscopie électronique à transmission. Cette observation nous a permis de confirmer le mode d'action de la nisine qui est une action au niveau de la membrane bactérienne qui entraîne une lyse de la cellule.

D'autre part, l'action de la nisine sur les spores de *C. difficile* a aussi été étudiée dans cette première partie. À partir de la souche de référence *C. difficile* ATCC630, des spores ont été produits et purifiés. La viabilité de ces derniers ainsi que leur germination ont été évaluées en présence de nisine. Les résultats obtenus montrent qu'à partir d'une concentration minimale de 12,8 µg/mL, la nisine est capable de réduire la viabilité des spores d'au moins

19 %. La meilleure efficacité de réduction observée est de 38 % à une concentration de nisine utilisée de 25,6 µg/mL. Les spores de *C. difficile* ont ensuite été mises en présence d'un agent stimulant la germination et de nisine. Lorsque les spores de *C. difficile* étaient inoculées sur un milieu contenant 3,2 µg/mL de nisine, leur taux de germination était réduit de plus de 99,99 %, comparativement au contrôle sans nisine (Fig. 3.4). Les spores de *C. difficile* sont l'un des vecteurs de transmission de l'infection entre les patients atteints et les patients non-infectés. Les trois principaux modes de transmission de l'infection sont le contact (1) entre les patients, (2) avec le personnel soignant et/ou (3) avec des surfaces contaminées par des spores. Les spores peuvent être ingérées, devenir des cellules végétatives et causer rapidement une infection. Si les conditions ne leurs sont pas favorables pour leur prolifération, les spores demeurent sous cette forme jusqu'à ce que les conditions idéales se présentent. L'antibiothérapie, de par son effet secondaire délétère sur le microbiote intestinal humain, peut favoriser la prolifération des spores et l'infection. S'il était possible de limiter les infections à *C. difficile*, par une action préventive sur les spores, leur transmission serait grandement limitée. Les taux d'infection seraient, par le fait même, réduits.

Après avoir démontré la capacité de la nisine à inhiber *C. difficile*, la résistance de la nisine et de sa souche productrice *L. lactis* UL719 lors du transit gastro-intestinal (TGI) ont été évaluées (Chapitre 4). Dans cette deuxième partie de l'étude, un modèle *in vitro*, le TIM-1, reproduisant les conditions physico-chimiques de la partie proximale du tube digestif, soit l'estomac et l'intestin grêle (constitué du duodénum, du jéjunum et de l'iléon) a été utilisé. Ainsi, deux stratégies possibles pour pouvoir amener l'activité inhibitrice contre *C. difficile* au niveau du côlon ont été émises. La première est la prise orale de la nisine et la seconde est la prise orale d'une souche productrice de nisine. Malgré que la nisine A ait démontré une meilleure activité inhibitrice que la nisine Z contre *C. difficile*, la souche productrice de nisine Z, *L. lactis* UL719 a été utilisée pour la suite des travaux. Ce choix est justifié par le très faible taux de survie de la souche *L. lactis* ATCC11454 (0,00073%), productrice de nisine A, lors de son passage dans le TGI, et par le fait que le taux de survie soit un caractère souche-dépendant [345]. La prise orale de nisine n'a pas donné les résultats espérés. Dans la partie du système qui représente l'estomac, l'activité antimicrobienne de la nisine n'est pas affectée par les conditions de pH très acide. Par contre, le passage dans le compartiment duodéal entraîne une perte totale de l'activité antimicrobienne de la nisine. La nature

peptidique de la nisine explique la perte d'activité. En effet, les enzymes protéolytiques contenues dans les sucs pancréatiques hydrolysent la nisine et entraînent la perte de son activité biologique.

De son côté, la prise orale de la souche productrice de nisine montre des résultats concluants. En effet, la souche *L. lactis* UL719 a été récupérée en quantité suffisante à la sortie de l'iléon ce qui représente l'entrée du côlon. Le taux de survie de la souche productrice est de 0,45 %, cette perte de viabilité s'explique par les conditions physico-chimiques rencontrées lors du tractus gastro-intestinal. Au cours de la digestion, *L. lactis* UL719 subit un stress acide au niveau de l'estomac avec une diminution du pH de 5,5 à 2. Cette baisse drastique de pH entraîne une réduction de la concentration cellulaire de *L. lactis* qui passe de $1,08 \times 10^9$ UFC/mL à $4,94 \times 10^4$ UFC/mL après 105 min de digestion. Une fois arrivé au niveau du duodénum, *L. lactis* UL719 subit essentiellement un stress avec les sels biliaires, qui jouent un grand rôle de défense pour l'hôte contre les microorganismes, en dégradant la membrane bactérienne [357]. Une fois passée ces deux premières sections du modèle *in vitro* de simulation du TGI, *L. lactis* UL719 ne semble plus être affectée par les conditions physico-chimiques rencontrées dans le jéjunum et dans l'iléon. Tout au long de la digestion, des cellules ont été prélevées dans les différents compartiments du TIM-1 afin de vérifier leur capacité à produire la bactériocine malgré les stress rencontrés. Suite aux tests d'activité menés sur gélose et en microplaques, toutes les souches testées ont gardé la même capacité à produire de la nisine autant que la souche contrôle n'ayant subi aucun stress. Au terme de la deuxième partie de l'étude, la souche productrice de nisine, *L. lactis* UL719, a démontré qu'elle était non seulement capable de survivre aux différents stress gastro-intestinaux pour se rendre en quantité suffisante au niveau du côlon, mais aussi de garder sa capacité à produire la bactériocine. Par contre, la nisine seule n'était pas stable lors de son passage dans le TGI et perdait son activité biologique, antimicrobienne, au passage du duodénum.

Dans la troisième partie de cette étude, (1) la capacité de la souche *L. lactis* UL719 à s'implanter au niveau du microbiote intestinal, (2) l'impact de *L. lactis* UL719 sur le microbiote et sur *C. difficile*, (3) l'impact de la nisine sur le microbiote et (4) la capacité de la nisine à inhiber *C. difficile* ont été évalués dans des conditions coliques. Afin de reproduire *in vitro* les conditions intestinales, un modèle de fermentation colique en continu, avec un

microbiote immobilisé a été utilisé [96, 105]. Le microbiote est immobilisé dans des billes de gellan/xanthane à partir de fèces d'un donneur sain, n'ayant pas eu d'antibiothérapie dans les trois derniers mois précédant le don. Une fois le microbiote immobilisé dans les billes, une période de stabilisation de 17 jours a été nécessaire afin d'obtenir un compte microbien constant pendant un minimum de 3 jours successifs. Le microbiote stabilisé a été soumis à différents traitements (chapitre 5) afin de répondre aux objectifs fixés dans cette partie de l'étude. La quantification des populations bactériennes constituant le microbiote a été effectuée par PCR en temps réel (qPCR) couplé avec un prétraitement au propidium monoazide (PMA). Ce prétraitement permet de quantifier uniquement les populations viables, car la molécule réagit avec l'ADN des cellules mortes et empêche l'amplification par PCR [395]. Grâce à cette méthode PMA-qPCR, il a été possible de suivre l'effet de la nisine et de la souche *L. lactis* UL719 sur différents groupes bactériens ainsi que sur *C. difficile* spécifiquement. La méthode PMA-qPCR comporte toutefois certaines limites. En effet, comme l'utilisation de la méthode repose sur la construction d'amorces spécifiques, seuls les microorganismes dont la séquence de certains gènes est disponible dans les bases de données publiques peuvent être ciblés.

Ces travaux ont permis de valider l'hypothèse selon laquelle la nisine peut inhiber *C. difficile* dans les conditions coliques. En effet, *C. difficile* subit une réduction décimale de 2,3 log₁₀ dans la première heure après l'ajout simultané de nisine (20× la CMI, 256 µg/mL) et de *C. difficile* (5×10⁶ UFC/mL), comparé à une diminution de 0,3 log₁₀ lorsque la souche de *C. difficile* est ajoutée seule à la même concentration. Cette diminution de 0,3 log₁₀ est due au lavage engendré par l'aspect dynamique du modèle. Par contre, avec un ajout de *L. lactis* UL719 (10⁹ UFC/mL) ou un ajout de nisine (5× la CMI, 64 µg/mL), aucune différence significative entre les traitements imposés et l'ajout de *C. difficile* seule. Étant donné les résultats, des optimisations seraient nécessaires afin de déterminer la concentration optimale de nisine à ajouter au système pour observer une réduction significative de *C. difficile*. Le manque d'efficacité spécifique de la nisine à faible concentration contre *C. difficile* pourrait s'expliquer par sa charge positive et sa capacité à se fixer d'une façon non-spécifique aux parois bactériennes par des interactions électrostatiques. De plus, il est possible qu'une partie de la nisine ajoutée subisse une hydrolyse par des protéases extracellulaires produites par le microbiote [285].

En ce qui concerne l'inefficacité de la souche productrice de nisine, plusieurs hypothèses peuvent être amenées. La nisine est produite dans la phase exponentielle de croissance de *L. lactis* [369]. Dans la présente étude, l'ajout simultané de *L. lactis* et de *C. difficile* a été suivi sur une période de 8 h. Dans ces conditions, la première hypothèse serait l'absence de croissance de *L. lactis* UL719 dans cet écosystème très compétitif, qui expliquerait l'absence de production de nisine, et donc l'absence d'inhibition de *C. difficile*. Par contre, la deuxième hypothèse serait que *L. lactis* UL719 pourrait croître et produire sa bactériocine, mais en trop faible quantité pour avoir un impact sur l'inhibition de *C. difficile*. Un début de réponse a été apporté par une étude effectuée au sein du groupe de recherche [369]. Cette étude a montré que *L. lactis* UL719 était capable de croître sur le milieu développé par Macfarlane *et al.*, [107] le milieu utilisé dans le modèle *in vitro* de fermentation colique. Ce milieu simule les nutriments disponibles au niveau du côlon. De plus, cette étude a démontré que la souche *L. lactis* UL719 était capable de produire sa bactériocine, la nisine, mais en plus faible quantité comparativement à une production dans les conditions optimales (256 UA/mL versus 4096 UA/mL).

Quant à l'impact sur le microbiote colique, l'ajout de la souche productrice ne semble pas engendrer de déséquilibre au niveau des groupes bactériens suivis. Il en est de même après un ajout de nisine à une concentration de 64 µg/mL (19 µM). Par contre, après un ajout de 256 µg/mL (76 µM) de nisine, une réduction significative (-0,7 log₁₀) de la flore totale a été observée. Cette réduction est expliquée par l'action de la nisine sur les groupes bactériens à Gram positif. En effet, le groupe des clostridies est particulièrement affecté (-3,5 log₁₀), il en est de même pour les groupes des lactobacilles et des bifidobactéries, mais avec un plus faible impact. Ce déséquilibre du microbiote colique n'est que de courte durée, car en moins de 24 h, il revient à son état initial (avant l'ajout). Ces résultats permettent de confirmer la non-sélectivité de la nisine tout en fournissant une explication sur son manque d'efficacité à inhiber *C. difficile* à faible concentration. Il aurait été intéressant de voir l'effet d'ajouts répétés, comme dans le cas d'une antibiothérapie, au niveau de l'impact sur *C. difficile* et du microbiote.

Cette étude, en milieu colique, a aussi permis de montrer que la souche productrice de nisine, *L. lactis* UL719, était capable de s'implanter dans le microbiote colique. Ce résultat a été confirmé par sa présence dans le système de fermentation colique à une concentration de

10⁸ UFC/mL en fin d'expérimentation. Ce résultat a été obtenu plus de 20 jours après le dernier ajout dans le système.

Dans cette étude, différents objectifs spécifiques ont été validés. Le premier objectif a permis de conclure que la nisine avait une activité inhibitrice *in vitro* contre des souches cliniques de *C. difficile*. Le second objectif a permis de conclure que la souche productrice était capable de survivre au tractus gastro-intestinal pour atteindre le côlon, tout en gardant sa capacité à produire la nisine. Il a également été démontré que la nisine seule perdait son activité biologique au cours du tractus gastro-intestinal, suite à une protéolyse par les enzymes pancréatiques. Finalement, le troisième objectif a permis de démontrer que la nisine était capable d'inhiber de façon significative *C. difficile* dans les conditions coliques reproduites avec le système *in vitro* de fermentation colique avec cellules immobilisées. De plus *L. lactis* UL719 est capable de s'implanter.

Au regard des résultats obtenus dans cette étude, plusieurs voies pourraient être explorées. Dans un premier temps, il faudrait confirmer les résultats obtenus pour l'activité antimicrobienne de la nisine avec des souches cliniques de *C. difficile* qui montrent une sensibilité réduite aux antibiotiques traditionnellement utilisés (vancomycine, métronidazole). En effet, au cours de cette étude, toutes les souches testées avaient une grande sensibilité à ces antibiotiques. Ensuite, le sujet du travail était de montrer une action inhibitrice sur *C. difficile*, il serait aussi très intéressant d'étudier l'effet de la nisine sur l'infectivité de *C. difficile* comme par exemple sur la production de toxines.

Dans un second temps, grâce à son activité inhibitrice sur les spores de *C. difficile*, il serait intéressant d'évaluer la nisine comme agent de désinfection pour diminuer la transmission de l'infection via les spores de patients infectés vers l'environnement médical, le personnel soignant et les autres patients. Elle pourrait être utilisée en combinaison avec des agents actuellement utilisés pour la désinfection des personnes et de l'environnement.

Dans le cadre d'une utilisation du métabolite actif de *L. lactis* (nisine) pour le traitement d'infection à *C. difficile*, il sera nécessaire de développer un système de protection de la nisine pour que celle-ci puisse agir au niveau du site de l'infection. Une protection aux sucs pancréatiques sera donc souhaitable.

Les paramètres expérimentaux utilisés pour évaluer l'action inhibitrice de la nisine contre *C. difficile* dans les conditions coliques pourraient être modifiées pour mieux correspondre aux personnes les plus sensibles à ces infections : les personnes âgées. En effet, pour notre modèle, le microbiote fécal utilisé était issu d'un jeune adulte en pleine forme et comme il a été montré dans la revue de littérature le microbiote évolue au cours des âges. De plus, il aurait été intéressant de simuler un traitement antibiotique avant de procéder à l'infection avec *C. difficile*, car il a été clairement identifié que l'infection à *C. difficile* est consécutive au déséquilibre du microbiote intestinal dû à la prise d'antibiotiques.

Les modèles *in vitro* ont beaucoup d'avantages (rapide, reproductible et peu coûteux) mais ont aussi certaines limites. En effet, dans les modèles *in vitro*, les interactions avec l'hôte ne sont pas prises en compte. Il serait donc très judicieux de valider les résultats obtenus sur l'inhibition de *C. difficile* en condition intestinale dans un modèle *in vivo*. Il faudrait aussi trouver des méthodes directes permettant de démontrer la production de nisine dans ces écosystèmes complexes. En effet, pour l'instant, aucune méthode ne permet de quantifier la production de bactériocines. Ces méthodes permettraient de confirmer, premièrement, si la souche productrice est capable ou non de produire sa bactériocine dans ces conditions, et deuxièmement, si elle en produit en quantité suffisante pour avoir son effet inhibiteur contre l'organisme cible.

De plus avec le fait que *L. lactis* UL719 soit capable de persister et de croître dans les conditions intestinales d'un modèle *in vitro*, il serait intéressant, dans un premier temps, de valider la capacité de *L. lactis* à s'implanter et à proliférer dans un modèle animal suite à une prise régulière de cette souche et dans un second temps, d'évaluer l'impact de cette implantation sur le microbiote et sur les effets éventuels sur l'hôte.

Références

1. Kuijper, E.J., B. Coignard, and P. Tüll, *Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe*. Clinical Microbiology and Infection, 2006. **12**(s6): p. 2-18.
2. Loo, V.G., L. Poirier, M.A. Miller, M. Oughton, M.D. Libman, S. Michaud, A.-M. Bourgault, T. Nguyen, C. Frenette, and M. Kelly, *A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(23): p. 2442-2449.
3. McDonald, L.C., G.E. Killgore, A. Thompson, R.C. Owens Jr, S.V. Kazakova, S.P. Sambol, S. Johnson, and D.N. Gerding, *An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(23): p. 2433-2441.
4. McGlone, S.M., R.R. Bailey, S.M. Zimmer, M.J. Popovich, Y. Tian, P. Ufberg, R.R. Muder, and B.Y. Lee, *The economic burden of Clostridium difficile*. Clinical Microbiology and Infection, 2011. **18**(3): p. 282-289.
5. Aslam, S., R.J. Hamill, and D.M. Musher, *Treatment of Clostridium difficile-associated disease: old therapies and new strategies*. The Lancet Infectious Diseases, 2005. **5**(9): p. 549-557.
6. Louie, T.J., K. Cannon, B. Byrne, J. Emery, L. Ward, M. Eyben, and W. Krulicki, *Fidaxomicin preserves the intestinal microbiome during and after treatment of Clostridium difficile infection (CDI) and reduces both toxin reexpression and recurrence of CDI*. Clinical Infectious Diseases, 2012. **55**(suppl 2): p. S132-S142.
7. Kassam, Z., R. Hundal, J.K. Marshall, and C.H. Lee, *Fecal transplant via retention enema for refractory or recurrent Clostridium difficile infection*. Archives of Internal Medicine, 2012. **172**(2): p. 191-193.
8. Pillai, A. and R. Nelson, *Probiotics for treatment of Clostridium difficile-associated colitis in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2008. **1**(1).
9. FAO/WHO, *Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.*, F.a.A.O.o.t.U. Nations, Editor. 2001, World Health Organization.
10. Okada, Y., Y. Tsuzuki, R. Hokari, S. Komoto, C. Kurihara, A. Kawaguchi, S. Nagao, and S. Miura, *Anti-inflammatory effects of the genus Bifidobacterium on macrophages by modification of phospho-I κ B and SOCS gene expression*. International Journal of Experimental Pathology, 2009. **90**(2): p. 131-140.
11. Doron, S.I., P.L. Hibberd, and S.L. Gorbach, *Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2008. **42**: p. S58-S63.
12. Majamaa, H., E. Isolauri, M. Saxelin, and T. Vesikari, *Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1995. **20**(3): p. 333-338.
13. Berni, C.R., R. Nocerino, G. Terrin, T. Frediani, S. Lucarelli, L. Cosenza, A. Passariello, L. Leone, V. Granata, and M. Di Costanzo, *Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of*

- tolerance: a prospective multicenter study.* The Journal of Pediatrics, 2013. **163**(3): p. 771-777. e1.
14. Wang, K.Y., S.N. Li, C.S. Liu, D.S. Perng, Y.C. Su, D.C. Wu, C.M. Jan, C.H. Lai, T.N. Wang, and W.M. Wang, *Effects of ingesting Lactobacillus-and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori.* The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. **80**(3): p. 737-741.
 15. O'Toole, P.W. and J.C. Cooney, *Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota.* Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2008. **2008**.
 16. Cotter, P.D., C. Hill, and R.P. Ross, *Bacteriocins: developing innate immunity for food.* Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(10): p. 777-788.
 17. Le Blay, G., C. Lacroix, A. Zihler, and I. Fliss, *In vitro inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria.* Letters in Applied Microbiology, 2007. **45**(3): p. 252-257.
 18. Isolauri, E., S. Salminen, and A.C. Ouwehand, *Probiotics.* Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2004. **18**(2): p. 299-313.
 19. Walter, J. and R.E. Ley, *The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes.* Annual Review of Microbiology, 2011. **65**: p. 411-429.
 20. Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W.M. de Vos, R. Fondén, M. Saxelin, K. Collins, and G. Mogensen, *Demonstration of safety of probiotics—a review.* International Journal of Food Microbiology, 1998. **44**(1): p. 93-106.
 21. Eckburg, P.B., E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, and D.A. Relman, *Diversity of the human intestinal microbial flora.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-1638.
 22. Frank, D.N., A.L.S. Amand, R.A. Feldman, E.C. Boedeker, N. Harpaz, and N.R. Pace, *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(34): p. 13780-13785.
 23. Ley, R.E., P.J. Turnbaugh, S. Klein, and J.I. Gordon, *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-1023.
 24. Tap, J., S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C.e. Caron, J.-P. Furet, E. Ugarte, R. Muñoz-Tamayo, D.L.E. Paslier, and R. Nalin, *Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core.* Environmental Microbiology, 2009. **11**(10): p. 2574-2584.
 25. Andersson, A.F., M. Lindberg, H. Jakobsson, F. Bäckhed, P. Nyrén, and L. Engstrand, *Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing.* PLoS ONE, 2008. **3**(7): p. e2836.
 26. Probert, H.M. and G.R. Gibson, *Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract.* Current Issues in Intestinal Microbiology, 2002. **3**(2): p. 23-27.
 27. Edwards, C.A. and A.M. Parrett, *Intestinal flora during the first months of life: new perspectives.* British Journal of Nutrition, 2002. **88**(S1): p. s11-s18.
 28. Grönlund, M.M., O.P. Lehtonen, E. Eerola, and P. Kero, *Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1999. **28**(1): p. 19-25.
 29. Mshvildadze, M. and J. Neu, *The infant intestinal microbiome: Friend or foe?* Early Human Development, 2010. **86**(1): p. 67-71.

30. Salminen, S., G.R. Gibson, A.L. McCartney, and E. Isolauri, *Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children*. Gut, 2004. **53**(9): p. 1388-1389.
31. Adlerberth, I. and A.E. Wold, *Establishment of the gut microbiota in Western infants*. Acta Paediatrica, 2009. **98**(2): p. 229-238.
32. Stark, P.L. and A. Lee, *The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life*. Journal of Medical Microbiology, 1982. **15**(2): p. 189-203.
33. Kleessen, E., J. Bezirtzoglou, and B. Mättö, *Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2000. **12**(2): p. 53-63.
34. Marques, T.M., R. Wall, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, C.A. Ryan, and C. Stanton, *Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors*. Current Opinion in Biotechnology, 2010. **21**(2): p. 149-156.
35. Penders, J., C. Thijs, C. Vink, F.F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P.A. van den Brandt, and E.E. Stobberingh, *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy*. Pediatrics, 2006. **118**(2): p. 511-521.
36. Fallani, M., D. Young, J. Scott, E. Norin, S. Amarri, R. Adam, M. Aguilera, S. Khanna, A. Gil, and C.A. Edwards, *Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010. **51**(1): p. 77-84.
37. Nowrouzian, F., B. Hesselmar, R. Saalman, I.-L. Strannegård, N. Åberg, A.E. Wold, and I. Adlerberth, *Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage*. Pediatric Research, 2003. **54**(1): p. 8-14.
38. Collado, M.C., S. Delgado, A. Maldonado, and J.M. Rodríguez, *Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR*. Letters in Applied Microbiology, 2009. **48**(5): p. 523-528.
39. Martín, R., H.G.H.J. Heilig, E.G. Zoetendal, E. Jiménez, L. Fernández, H. Smidt, and J.M. Rodríguez, *Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women*. Research in Microbiology, 2007. **158**(1): p. 31-37.
40. Coppa, G.V., S. Bruni, L. Morelli, S. Soldi, and O. Gabrielli, *The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2004. **38**: p. S80-S83.
41. Zivkovic, A.M., J.B. German, C.B. Lebrilla, and D.A. Mills, *Human milk glyco-biome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(Supplement 1): p. 4653-4658.
42. Lundequist, B., C.E. Nord, and J. Winberg, *The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks*. Acta Paediatrica, 1985. **74**(1): p. 45-51.
43. Roger, L.C., A. Costabile, D.T. Holland, L. Hoyles, and A.L. McCartney, *Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast-and formula-fed infants during the first 18 months of life*. Microbiology, 2010. **156**(11): p. 3329-3341.
44. Grönlund, M.M., M. Gueimonde, K. Laitinen, G. Kociubinski, T. Grönroos, S. Salminen, and E. Isolauri, *Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide*

- the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease.* Clinical & Experimental Allergy, 2007. **37**(12): p. 1764-1772.
45. Tanaka, S., T. Kobayashi, P. Songjinda, A. Tateyama, M. Tsubouchi, C. Kiyohara, T. Shirakawa, K. Sonomoto, and J. Nakayama, *Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota.* FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2009. **56**(1): p. 80-87.
 46. Favier, C.F., W.M. de Vos, and A.D.L. Akkermans, *Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies.* Anaerobe, 2003. **9**(5): p. 219-229.
 47. Gaboriau-Routhiau, V., S. Rakotobe, E. Lécuyer, I. Mulder, A. Lan, C. Bridonneau, V. Rochet, A. Pisi, M. De Paepe, and G. Brandi, *The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses.* Immunity, 2009. **31**(4): p. 677-689.
 48. Atarashi, K., T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, and Y. Ohba, *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species.* Science, 2011. **331**(6015): p. 337-341.
 49. Round, J.L., S.M. Lee, J. Li, G. Tran, B. Jabri, T.A. Chatila, and S.K. Mazmanian, *The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota.* Science, 2011. **332**(6032): p. 974-977.
 50. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system.* Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(6): p. 478-485.
 51. Hooper, L., *Do symbiotic bacteria subvert host immunity?* Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(5): p. 367-374.
 52. Salzman, N.H., M.A. Underwood, and C.L. Bevins. *Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa.* in *Seminars in immunology.* 2007. Elsevier.
 53. Cash, H.L., C.V. Whitham, C.L. Behrendt, and L.V. Hooper, *Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin.* Science, 2006. **313**(5790): p. 1126-1130.
 54. Vaishnava, S., C.L. Behrendt, A.S. Ismail, L. Eckmann, and L.V. Hooper, *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(52): p. 20858-20863.
 55. Hooper, L.V., T.S. Stappenbeck, C.V. Hong, and J.I. Gordon, *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity.* Nature immunology, 2003. **4**(3): p. 269-273.
 56. Schaubert, J., C. Svanholm, S. Termen, K. Iffland, T. Menzel, W. Scheppach, R. Melcher, B. Agerberth, H. Lühns, and G.H. Gudmundsson, *Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways.* Gut, 2003. **52**(5): p. 735-741.
 57. Termén, S., M. Tollin, E. Rodriguez, S.H. Sveinsdóttir, B. Jóhannesson, A. Cederlund, J. Sjövall, B. Agerberth, and G.H. Gudmundsson, *PU. 1 and bacterial metabolites regulate the human gene CAMP encoding antimicrobial peptide LL-37 in colon epithelial cells.* Molecular Immunology, 2008. **45**(15): p. 3947-3955.

58. López-Boado, Y.S., C.L. Wilson, L.V. Hooper, J.I. Gordon, S.J. Hultgren, and W.C. Parks, *Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells*. The Journal of Cell Biology, 2000. **148**(6): p. 1305-1315.
59. Wagner, C.L., S.N. Taylor, and D. Johnson, *Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation*. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2008. **34**(2): p. 191-204.
60. Salminen, S. and E. Isolauri, *Intestinal colonization, microbiota, and probiotics*. The Journal of Pediatrics, 2006. **149**(5): p. S115-S120.
61. Alam, M., T. Midtvedt, and A. Uribe, *Differential cell kinetics in the ileum and colon of germ-free rats*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1994. **29**(5): p. 445-451.
62. Shanahan, F., *The host-microbe interface within the gut*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2002. **16**(6): p. 915-931.
63. Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane, *The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon*. Journal of Applied Bacteriology, 1991. **70**(6): p. 443-459.
64. Flint, H.J., E.A. Bayer, M.T. Rincon, R. Lamed, and B.A. White, *Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(2): p. 121-131.
65. Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane, *Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 1997. **21**(6): p. 357-365.
66. Flint, H.J., S.H. Duncan, K.P. Scott, and P. Louis, *Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health*. Environmental Microbiology, 2007. **9**(5): p. 1101-1111.
67. Macfarlane, G.T. and G.R. Gibson, *Metabolic activities of the normal colonic flora, in Human Health*. 1994, Springer. p. 17-52.
68. Juste, C., *Acides gras alimentaires, flore intestinale et cancer*. Bulletin du Cancer, 2005. **92**(7): p. 708-721.
69. Jaeger, K.E., S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. Heuvel, and O. Misset, *Bacterial lipases*. FEMS Microbiology Reviews, 1994. **15**(1): p. 29-63.
70. Howard, F.A.C. and C. Henderson, *Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria*. Letters in Applied Microbiology, 1999. **29**(3): p. 193-196.
71. Midtvedt, T., E. Lingaas, B. Carlstedt-Duke, T. Höverstad, A.C. Midtvedt, H. Saxerholt, M. Steinbakk, and K.E. Norin, *Intestinal microbial conversion of cholesterol to coprostanol in man*. APMIS, 1990. **98**(7-12): p. 839-844.
72. Guarner, F. and J.R. Malagelada, *Gut flora in health and disease*. The Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512-519.
73. Rajendhran, J. and P. Gunasekaran, *Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond*. Microbiological Research, 2011. **166**(2): p. 99-110.
74. Carey, C.M., J.L. Kirk, S. Ojha, and M. Kostrzynska, *Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness*. Canadian Journal of Microbiology, 2007. **53**(5): p. 537-550.
75. Postollec, F., H. Falentin, S. Pavan, J. Combrisson, and D. Sohier, *Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology*. Food Microbiology, 2011. **28**(5): p. 848-861.

76. Nocker, A., P. Sossa-Fernandez, M.D. Burr, and A.K. Camper, *Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(16): p. 5111-5117.
77. Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden, *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(3): p. 695-700.
78. Muyzer, G., *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current Opinion in Microbiology, 1999. **2**(3): p. 317-322.
79. Zoetendal, E.G., A.D.L. Akkermans, and W.M. De Vos, *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(10): p. 3854-3859.
80. Osborn, A.M., E.R.B. Moore, and K.N. Timmis, *An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics*. Environmental Microbiology, 2000. **2**(1): p. 39-50.
81. Li, F., M.A.J. Hullar, and J.W. Lampe, *Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota*. Journal of Microbiological Methods, 2007. **68**(2): p. 303-311.
82. Moter, A. and U.B. Göbel, *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms*. Journal of Microbiological Methods, 2000. **41**(2): p. 85-112.
83. Nadal, I., E. Donant, C. Ribes-Koninckx, M. Calabuig, and Y. Sanz, *Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease*. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**(12): p. 1669-1674.
84. Palmer, C., E.M. Bik, M.B. Eisen, P.B. Eckburg, T.R. Sana, P.K. Wolber, D.A. Relman, and P.O. Brown, *Rapid quantitative profiling of complex microbial populations*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(1): p. e5-e5.
85. Rajilić-Stojanović, M., H.G.H.J. Heilig, D. Molenaar, K. Kajander, A. Surakka, H. Smidt, and W.M. De Vos, *Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phlotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults*. Environmental Microbiology, 2009. **11**(7): p. 1736-1751.
86. Rajilić-Stojanović, M., A. Maathuis, H.G.H.J. Heilig, K. Venema, W.M. de Vos, and H. Smidt, *Evaluating the microbial diversity of an in vitro model of the human large intestine by phylogenetic microarray analysis*. Microbiology, 2010. **156**(11): p. 3270-3281.
87. Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J.J. Godon, G.R. Gibson, M.D. Collins, and J. Doré, *Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(11): p. 4799-4807.
88. Andoh, A., Y. Benno, O. Kanauchi, and Y. Fujiyama, *Recent advances in molecular approaches to gut microbiota in inflammatory bowel disease*. Current Pharmaceutical Design, 2009. **15**(18): p. 2066-2073.

89. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
90. Liu, L., Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu, and M. Law, *Comparison of next-generation sequencing systems*. BioMed Research International, 2012. **2012**.
91. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2008. **9**: p. 387-402.
92. Rea, M.C., A. Dobson, O. O'Sullivan, F. Crispie, F. Fouhy, P.D. Cotter, F. Shanahan, B. Kiely, C. Hill, and R.P. Ross, *Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on Clostridium difficile and microbial diversity in a model of the distal colon*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(Supplement 1): p. 4639-4644.
93. Consortium, H.M.P., *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 207-214.
94. Mitra, S., K. Förster-Fromme, A. Damms-Machado, T. Scheurenbrand, S. Biskup, D.H. Huson, and S.C. Bischoff, *Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD 16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing*. BMC Genomics, 2013. **14**(Suppl 5): p. S16.
95. Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K.S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, and T. Yamada, *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
96. Cinquin, C., G. Le Blay, I. Fliss, and C. Lacroix, *Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an in vitro colonic fermentation model*. Microbial Ecology, 2004. **48**(1): p. 128-138.
97. Cinquin, C., G. Le Blay, I. Fliss, and C. Lacroix, *New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota*. FEMS Microbiology Ecology, 2006. **57**(2): p. 324-336.
98. Macfarlane, G.T. and S. Macfarlane, *Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut*. Current opinion in biotechnology, 2007. **18**(2): p. 156-162.
99. Van den Abbeele, P., C. Grootaert, M. Marzorati, S. Possemiers, W. Verstraete, P. Gérard, S. Rabot, A. Bruneau, S. El Aidy, and M. Derrien, *Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for Bacteroidetes and Clostridium cluster IX*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. **76**(15): p. 5237-5246.
100. Zihler-Berner, A., S. Fuentes, A. Dostal, A.N. Payne, P.V. Gutierrez, C. Chassard, F. Grattepanche, W.M. de Vos, and C. Lacroix, *Novel Polyfermentor Intestinal Model (PolyFermS) for controlled ecological studies: validation and effect of pH*. PLOS ONE, 2013.
101. Lesmes, U., E.J. Beards, G.R. Gibson, K.M. Tuohy, and E. Shimoni, *Effects of resistant starch type III polymorphs on human colon microbiota and short chain fatty acids in human gut models*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(13): p. 5415-5421.
102. Pompei, A., L. Cordisco, S. Raimondi, A. Amaretti, U.M. Pagnoni, D. Matteuzzi, and M. Rossi, *In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans*. Anaerobe, 2008. **14**(5): p. 280-286.

103. Gumienna, M., M. Lasik, and Z. Czarnecki, *Bioconversion of grape and chokeberry wine polyphenols during simulated gastrointestinal in vitro digestion*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2011. **62**(3): p. 226-233.
104. Le Blay, G., J. Rytka, A. Zihler, and C. Lacroix, *New in vitro colonic fermentation model for Salmonella infection in the child gut*. FEMS Microbiology Ecology, 2009. **67**(2): p. 198-207.
105. Le Blay, G., R. Hammami, C. Lacroix, and I. Fliss, *Stability and inhibitory activity of pediocin PA-1 against Listeria sp. in simulated physiological conditions of the human terminal ileum*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2012. **4**(4): p. 250-258.
106. Macfarlane, G.T., G.R. Gibson, and J.H. Cummings, *Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon*. Journal of Applied Bacteriology, 1992. **72**(1): p. 57-64.
107. Macfarlane, G.T., S. Macfarlane, and G.R. Gibson, *Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon*. Microbial Ecology, 1998. **35**(2): p. 180-187.
108. Zihler, A., M. Gagnon, C. Chassard, A. Hegland, M.J.A. Stevens, C.P. Braegger, and C. Lacroix, *Unexpected consequences of administering bacteriocinogenic probiotic strains for Salmonella populations, revealed by an in vitro colonic model of the child gut*. Microbiology, 2010. **156**(11): p. 3342-3353.
109. De Boever, P., R. Wouters, V. Vermeirssen, N. Boon, and W. Verstraete, *Development of a six-stage culture system for simulating the gastrointestinal microbiota of weaned infants*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2001. **13**(2): p. 111-123.
110. Sghir, A., J.M. Chow, and R.I. Mackie, *Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate*. Journal of applied Microbiology, 1998. **85**(4): p. 769-777.
111. Macfarlane, S. and J.F. Dillon, *Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract*. Journal of Applied Microbiology, 2007. **102**(5): p. 1187-1196.
112. Doleyres, Y., I. Fliss, and C. Lacroix, *Quantitative determination of the spatial distribution of pure-and mixed-strain immobilized cells in gel beads by immunofluorescence*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **59**(2-3): p. 297-302.
113. Doleyres, Y., C. Paquin, M. LeRoy, and C. Lacroix, *Bifidobacterium longum ATCC 15707 cell production during free-and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **60**(1-2): p. 168-173.
114. Lacroix, C., F. Grattepanche, Y. Doleyres, and D. Bergmaier, *Immobilised cell technologies for the dairy industry*, in *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*. 2005, Springer. p. 295-319.
115. Le Blay, G., C. Chassard, S. Baltzer, and C. Lacroix, *Set up of a new in vitro model to study dietary fructans fermentation in formula-fed babies*. British Journal of Nutrition, 2010. **103**(3): p. 403.
116. Minekus, M., M. Smeets-Peeters, A. Bernalier, S. Marol-Bonnin, R. Havenaar, P. Marteau, M. Alric, and G. Fonty, *A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and*

- absorption of fermentation products*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999. **53**(1): p. 108-114.
117. Molly, K., M.V. Woestyne, and W. Verstraete, *Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993. **39**(2): p. 254-258.
 118. Payne, A.N., A. Zihler, C. Chassard, and C. Lacroix, *Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(1): p. 17-25.
 119. Duncan, S.H., P. Louis, J.M. Thomson, and H.J. Flint, *The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota*. Environmental Microbiology, 2009. **11**(8): p. 2112-2122.
 120. Maccaferri, S., B. Vitali, A. Klinder, S. Kolida, M. Ndagijimana, L. Laghi, F. Calanni, P. Brigidi, G.R. Gibson, and A. Costabile, *Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010: p. dkq345.
 121. Blanquet-Diot, S., M. Soufi, M. Rambeau, E. Rock, and M. Alric, *Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system*. The Journal of Nutrition, 2009. **139**(5): p. 876-883.
 122. Kovatcheva-Datchary, P., M. Egert, A. Maathuis, M. Rajilić-Stojanović, A.A. De Graaf, H. Smidt, W.M. De Vos, and K. Venema, *Linking phylogenetic identities of bacteria to starch fermentation in an in vitro model of the large intestine by RNA-based stable isotope probing*. Environmental Microbiology, 2009. **11**(4): p. 914-926.
 123. Bailey, M.T. and C.L. Coe, *Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys*. Developmental Psychobiology, 1999. **35**(2): p. 146-155.
 124. Gibson, G.R., *Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin*. The Journal of Nutrition, 1999. **129**(7): p. 1438S-1441S.
 125. Florin, T., G. Neale, G.R. Gibson, S.U. Christl, and J.H. Cummings, *Metabolism of dietary sulphate: absorption and excretion in humans*. Gut, 1991. **32**(7): p. 766-773.
 126. Levitt, M.D., G.R. Gibson, and S.U. Christl, *Gas metabolism in the large intestine*. Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology, 1995: p. 131-54.
 127. Murawaki, Y., M. Kobayashi, M. Koda, and H. Kawasakia, *Effects of lactulose on intestinal bacterial flora and fecal organic acids in patients with liver cirrhosis*. Hepatology Research, 2000. **17**(1): p. 56-64.
 128. Kruis, W., G. Forstmaier, C. Scheurlen, and F. Stellaard, *Effect of diets low and high in refined sugars on gut transit, bile acid metabolism, and bacterial fermentation*. Gut, 1991. **32**(4): p. 367-371.
 129. Lewis, S.J. and K.W. Heaton, *The metabolic consequences of slow colonic transit*. The American Journal of Gastroenterology, 1999. **94**(8): p. 2010-2016.
 130. Moore, W.E.C., E.P. Cato, and L.V. Holdeman, *Some current concepts in intestinal bacteriology*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1978. **31**(10): p. S33-S42.
 131. Keeney, K.M., S. Yurist-Doutsch, M.C. Arrieta, and B.B. Finlay, *Effect of Antibiotics on the Microbiota and Subsequent Disease*. Annual Review of Microbiology, 2014. **68**(1).

132. Nord, C.E., *Studies on the ecological impact of antibiotics*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1990. **9**(7): p. 517-518.
133. Ramakrishna, B.S. and V.I. Mathan, *Colonic dysfunction in acute diarrhoea: the role of luminal short chain fatty acids*. Gut, 1993. **34**(9): p. 1215-1218.
134. Gorbach, S.L., M. Barza, M. Giuliano, and N.V. Jacobus, *Colonization resistance of the human intestinal microflora: Testing the hypothesis in normal volunteers*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1988. **7**(1): p. 98-102.
135. Young, V.B. and T.M. Schmidt, *Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(3): p. 1203-1206.
136. Hurley, B.W. and C.C. Nguyen, *The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea*. Archives of Internal Medicine, 2002. **162**(19): p. 2177-2184.
137. McFarland, L.V., *Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment*. 2008.
138. Antharam, V.C., E.C. Li, A. Ishmael, A. Sharma, V. Mai, K.H. Rand, and G.P. Wang, *Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in Clostridium difficile infection and nosocomial diarrhea*. Journal of Clinical Microbiology, 2013. **51**(9): p. 2884-2892.
139. Lepage, P., R. Häslér, M.E. Spehlmann, A. Rehman, A. Zvirbliene, A. Begun, S. Ott, L. Kupcinskis, J. Doré, and A. Raedler, *Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 227-236.
140. Wang, T., G. Cai, Y. Qiu, N. Fei, M. Zhang, X. Pang, W. Jia, S. Cai, and L. Zhao, *Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers*. The ISME Journal, 2012. **6**(2): p. 320-329.
141. Hall, I.C. and E. O'Toole, *Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, Bacillus difficilis*. American Journal of Diseases of Children, 1935. **49**(2): p. 390-402.
142. Rousseau, C., I. Poilane, L. De Pontual, A.-C. Maherault, A. Le Monnier, and A. Collignon, *Clostridium difficile carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains*. Clinical Infectious Diseases, 2012. **55**(9): p. 1209-1215.
143. Altemeier, W.A., R.P. Hummel, and E.O. Hill, *Staphylococcal enterocolitis following antibiotic therapy*. Annals of Surgery, 1963. **157**(6): p. 847.
144. Bartlett, J.G., A.B. Onderdonk, and R.L. Cisneros, *Clindamycin-associated colitis in hamsters: protection with vancomycin*. Gastroenterology, 1977. **73**(4 Pt 1): p. 772-776.
145. Tedesco, F.J., R.W. Barton, and D.H. Alpers, *Clindamycin-Associated Colitis. A Prospective Study*. Annals of Internal Medicine, 1974. **81**(4): p. 429-433.
146. Bartlett, J.G., T.W. Chang, M. Gurwith, S.L. Gorbach, and A.B. Onderdonk, *Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia*. New England Journal of Medicine, 1978. **298**(10): p. 531-534.
147. Larson, H.E. and A.B. Price, *Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin*. The Lancet, 1977. **310**(8052): p. 1312-1314.

148. Rifkin, G.D., F.R. Fekety, J. Silva Jr, and R.B. Sack, *Antibiotic-induced colitis implication of a toxin neutralised by Clostridium sordellii antitoxin*. The Lancet, 1977. **310**(8048): p. 1103-1106.
149. Bartlett, J.G. and D.N. Gerding, *Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **46**(Supplement 1): p. S12-S18.
150. Gerding, D.N., *Clostridium difficile 30 years on: what has, or has not, changed and why?* International Journal of Antimicrobial Agents, 2009. **33**: p. S2-S8.
151. Warny, M., J. Pepin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J.S. Brazier, E. Frost, and L.C. McDonald, *Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe*. The Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1079-1084.
152. Borriello, S.P. and M.H. Wilcox, *Clostridium difficile infections of the gut: the unanswered questions*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998. **41**(suppl 3): p. 67-69.
153. Voth, D.E. and J.D. Ballard, *Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease*. Clinical Microbiology Reviews, 2005. **18**(2): p. 247-263.
154. Davies, H.A., A.K. Roberts, and C.C. Shone, *Super toxins from a super bug: structure and function of Clostridium difficile toxins*. Biochemical Journal, 2011. **436**(3): p. 517-526.
155. Schwan, C., T. Nölke, A.S. Kruppke, D.M. Schubert, A.E. Lang, and K. Aktories, *Cholesterol-and sphingolipid-rich microdomains are essential for microtubule-based membrane protrusions induced by Clostridium difficile transferase (CDT)*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(33): p. 29356-29365.
156. Jank, T. and K. Aktories, *Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model*. Trends in Microbiology, 2008. **16**(5): p. 222-229.
157. Braun, V., T. Hundsberger, P. Leukel, M. Sauerborn, and C. von Eichel-Streiber, *Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in Clostridium difficile*. Gene, 1996. **181**(1): p. 29-38.
158. Mani, N. and B. Dupuy, *Regulation of toxin synthesis in Clostridium difficile by an alternative RNA polymerase sigma factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(10): p. 5844-5849.
159. Matamouros, S., P. England, and B. Dupuy, *Clostridium difficile toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC*. Molecular microbiology, 2007. **64**(5): p. 1274-1288.
160. Genisyuerk, S., P. Papatheodorou, G. Guttenberg, R. Schubert, R. Benz, and K. Aktories, *Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of Clostridium difficile toxin B*. Molecular Microbiology, 2011. **79**(6): p. 1643-1654.
161. Guttenberg, G., P. Papatheodorou, S. Genisyuerk, W. Lü, T. Jank, O. Einsle, and K. Aktories, *Inositol hexakisphosphate-dependent processing of Clostridium sordellii lethal toxin and Clostridium novyi alpha-toxin*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(17): p. 14779-14786.
162. Shen, A., *Clostridium difficile toxins: mediators of inflammation*. Journal of Innate Immunity, 2012. **4**(2): p. 149-158.
163. Pothoulakis, C., I. Castagliuolo, and J.T. LaMont, *Nerves and intestinal mast cells modulate responses to enterotoxins*. Physiology, 1998. **13**(2): p. 58-63.

164. Pothoulakis, C., *Effects of Clostridium difficile toxins on epithelial cell barrier*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000. **915**(1): p. 347-356.
165. Barth, H., K. Aktories, M.R. Popoff, and B.G. Stiles, *Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004. **68**(3): p. 373-402.
166. Papatheodorou, P., J.E. Carette, G.W. Bell, C. Schwan, G. Guttenberg, T.R. Brummelkamp, and K. Aktories, *Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin Clostridium difficile transferase (CDT)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(39): p. 16422-16427.
167. Carter, G.P., D. Lyras, D.L. Allen, K.E. Mackin, P.M. Howarth, J.R. O'connor, and J.I. Rood, *Binary toxin production in Clostridium difficile is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator*. Journal of Bacteriology, 2007. **189**(20): p. 7290-7301.
168. Kaiser, E., C. Kroll, K. Ernst, C. Schwan, M.R. Popoff, G. Fischer, J. Buchner, K. Aktories, and H. Barth, *Membrane translocation of binary actin-ADP-ribosylating toxins from Clostridium difficile and Clostridium perfringens is facilitated by cyclophilin A and Hsp90*. Infection and Immunity, 2011. **79**(10): p. 3913-3921.
169. Haug, G., K. Aktories, and H. Barth, *The host cell chaperone Hsp90 is necessary for cytotoxic action of the binary iota-like toxins*. Infection and Immunity, 2004. **72**(5): p. 3066-3068.
170. Braun, M., K. Stuber, Y. Schlatter, T. Wahli, P. Kuhnert, and J. Frey, *Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AexT) from Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(7): p. 1851-1858.
171. Schwan, C., B. Stecher, T. Tzivelekidis, M. van Ham, M. Rohde, W.-D. Hardt, J. Wehland, and K. Aktories, *Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria*. PLOS Pathogens, 2009. **5**(10): p. e1000626.
172. Stanley, J.D. and R.P. Burns, *Clostridium difficile and the surgeon*. The American Surgeon, 2010. **76**(3): p. 235.
173. Walker, A.S., D.W. Eyre, D.H. Wyllie, K.E. Dingle, R.M. Harding, L. O'Connor, D. Griffiths, A. Vaughan, J. Finney, and M.H. Wilcox, *Characterisation of Clostridium difficile Hospital Ward-Based Transmission Using Extensive Epidemiological Data and Molecular Typing*. PLOS Medicine, 2012. **9**(2): p. e1001172.
174. McDonald, L.C., F. Lessa, D. Sievert, M. Wise, R. Herrera, C. Gould, P. Malpiedi, M. Dudeck, A. Srinivasan, and S. Fridkin, *Vital signs: preventing Clostridium difficile infections*. Centers for Disease Control MMWR, 2012. **61**: p. 1-6.
175. Cohen, S.H., D.N. Gerding, S. Johnson, C.P. Kelly, V.G. Loo, L.C. McDonald, J. Pepin, and M.H. Wilcox, *Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 2010. **31**(5): p. 431-455.
176. Chang, J.Y., D.A. Antonopoulos, A. Kalra, A. Tonelli, W.T. Khalife, T.M. Schmidt, and V.B. Young, *Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea*. Journal of Infectious Diseases, 2008. **197**(3): p. 435-438.

177. Mullane, K.M., M.A. Miller, K. Weiss, A. Lentnek, Y. Golan, P.S. Sears, Y.-K. Shue, T.J. Louie, and S.L. Gorbach, *Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for Clostridium difficile infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections*. Clinical Infectious Diseases, 2011. **53**(5): p. 440-447.
178. Tannock, G.W., K. Munro, C. Taylor, B. Lawley, W. Young, B. Byrne, J. Emery, and T. Louie, *A new macrocyclic antibiotic, fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of Clostridium difficile-infected patients than does vancomycin*. Microbiology, 2010. **156**(11): p. 3354-3359.
179. Hensgens, M.P.M., A. Goorhuis, O.M. Dekkers, and E.J. Kuijper, *Time interval of increased risk for Clostridium difficile infection after exposure to antibiotics*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. **67**(3): p. 742-748.
180. Stevens, V., G. Dumyati, L.S. Fine, S.G. Fisher, and E. van Wijngaarden, *Cumulative antibiotic exposures over time and the risk of Clostridium difficile infection*. Clinical Infectious Diseases, 2011. **53**(1): p. 42-48.
181. Brown, E., G.H. Talbot, P. Axelrod, M. Provencher, and C. Hoegg, *Risk factors for Clostridium difficile toxin-associated diarrhea*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1990: p. 283-290.
182. Rogers, M.A.M., M.T. Greene, S. Saint, C.E. Chenoweth, P.N. Malani, I. Trivedi, and D.M. Aronoff, *Higher rates of Clostridium difficile infection among smokers*. PLoS ONE, 2012. **7**(7): p. e42091.
183. Kent, K.C., M.S. Rubin, L. Wroblewski, P.A. Hanff, and W. Silen, *The impact of Clostridium difficile on a surgical service: a prospective study of 374 patients*. Annals of Surgery, 1998. **227**(2): p. 296.
184. Bavishi, C. and H.L. Dupont, *Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2011. **34**(11-12): p. 1269-1281.
185. Bauer, M.P., E.J. Kuijper, and J.T. van Dissel, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for Clostridium difficile infection (CDI)*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(12): p. 1067-79.
186. Olson, M.M., C.J. Shanholtzer, J.T. Lee Jr, and D.N. Gerding, *Ten years of prospective Clostridium difficile-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982-1991*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1994: p. 371-381.
187. Nelson, R.L., P. Kelsey, H. Leeman, N. Meardon, H. Patel, K. Paul, R. Rees, B. Taylor, E. Wood, and R. Malakun, *Antibiotic treatment for Clostridium difficile-associated diarrhea in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2011. **9**.
188. Zar, F.A., S.R. Bakkanagari, K. Moorthi, and M.B. Davis, *A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea, stratified by disease severity*. Clinical Infectious Diseases, 2007. **45**(3): p. 302-307.
189. Debast, S.B., M.P. Bauer, and E.J. Kuijper, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection*. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(s2): p. 1-26.
190. Louie, T.J., M.A. Miller, K.M. Mullane, K. Weiss, A. Lentnek, Y. Golan, S.L. Gorbach, P.S. Sears, and Y.-K. Shue, *Fidaxomicin versus vancomycin for*

- Clostridium difficile* infection. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(5): p. 422-431.
191. Vardakas, K.Z., K.A. Polyzos, K. Patouni, P.I. Rafailidis, G. Samonis, and M.E. Falagas, *Treatment failure and recurrence of Clostridium difficile infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012. **40**(1): p. 1-8.
 192. Peláez, T., L. Alcalá, R. Alonso, M. Rodríguez-Créixems, J.M. García-Lechuz, and E. Bouza, *Reassessment of Clostridium difficile susceptibility to metronidazole and vancomycin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. **46**(6): p. 1647-1650.
 193. Peláez, T., E. Cercenado, L. Alcalá, M. Marin, A. Martín-López, J. Martínez-Alarcón, P. Catalán, M. Sánchez-Somolinos, and E. Bouza, *Metronidazole resistance in Clostridium difficile is heterogeneous*. Journal of Clinical Microbiology, 2008. **46**(9): p. 3028-3032.
 194. Johnson, S., C. Schrieffer, U. Patel, T. Patel, D.W. Hecht, and D.N. Gerding, *Rifaximin Redux: Treatment of recurrent Clostridium difficile infections with Rifaximin immediately post-vancomycin treatment*. Anaerobe, 2009. **15**(6): p. 290-291.
 195. Musher, D.M., N. Logan, A.M. Bressler, D.P. Johnson, and J.-F. Rossignol, *Nitazoxanide versus vancomycin in Clostridium difficile infection: a randomized, double-blind study*. Clinical Infectious Diseases, 2009. **48**(4): p. e41-e46.
 196. Musher, D.M., N. Logan, V. Mehendiratta, N.A. Melgarejo, S. Garud, and R.J. Hamill, *Clostridium difficile colitis that fails conventional metronidazole therapy: response to nitazoxanide*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **59**(4): p. 705-710.
 197. McPherson, S., C.J. Rees, R. Ellis, S. Soo, and S.J. Panter, *Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent Clostridium difficile diarrhea*. Diseases of the Colon & Rectum, 2006. **49**(5): p. 640-645.
 198. Wilcox, M.H., *Descriptive study of intravenous immunoglobulin for the treatment of recurrent Clostridium difficile diarrhoea*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004. **53**(5): p. 882-884.
 199. Leav, B.A., B. Blair, M. Leney, M. Knauber, C. Reilly, I. Lowy, D.N. Gerding, C.P. Kelly, K. Katchar, and R. Baxter, *Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent Clostridium difficile infection (CDI)*. Vaccine, 2010. **28**(4): p. 965-969.
 200. Eiseman, B., W. Silen, G.S. Bascom, and A.J. Kauvar, *Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis*. Surgery, 1958. **44**(5): p. 854-859.
 201. Bakken, J.S., T. Borody, L.J. Brandt, J.V. Brill, D.C. Demarco, M.A. Franzos, C.P. Kelly, A. Khoruts, T. Louie, and L.P. Martinelli, *Treating Clostridium difficile Infection With Fecal Microbiota Transplantation*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2011. **9**(12): p. 1044-1049.
 202. Gough, E., H. Shaikh, and A.R. Manges, *Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent Clostridium difficile infection*. Clinical Infectious Diseases, 2011. **53**(10): p. 994-1002.
 203. Grehan, M.J., T.J. Borody, S.M. Leis, J. Campbell, H. Mitchell, and A. Wettstein, *Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2010. **44**(8): p. 551-561.

204. Lawrence, S.J., J.R. Korzenik, and L.M. Mundy, *Probiotics for recurrent Clostridium difficile disease*. Journal of Medical Microbiology, 2005. **54**(9): p. 905-906.
205. McFarland, L.V., C.M. Surawicz, R.N. Greenberg, R. Fekety, G.W. Elmer, K.A. Moyer, S.A. Melcher, K.E. Bowen, J.L. Cox, and Z. Noorani, *A randomized placebo-controlled trial of Saccharomyces boulardii in combination with standard antibiotics for Clostridium difficile disease*. JAMA, 1994. **271**(24): p. 1913-1918.
206. Surawicz, C.M., L.V. McFarland, R.N. Greenberg, M. Rubin, R. Fekety, M.E. Mulligan, R.J. Garcia, S. Brandmarker, K. Bowen, and D. Borjal, *The search for a better treatment for recurrent Clostridium difficile disease: use of high-dose vancomycin combined with Saccharomyces boulardii*. Clinical Infectious Diseases, 2000. **31**(4): p. 1012-1017.
207. Gao, X.W., M. Mubasher, C.Y. Fang, C. Reifer, and L.E. Miller, *Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of Lactobacillus acidophilus CL1285 and Lactobacillus casei LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile-associated diarrhea prophylaxis in adult patients*. The American Journal of Gastroenterology, 2010.
208. Metchnikoff, E., *The prolongation of life*. New York: GP Putman's Sons, 1907.
209. Lilly, D.M. and R.H. Stillwell, *Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms*. Science, 1965. **147**(3659): p. 747-748.
210. Parker, R.B., *Probiotics, the other half of the antibiotic story*. Anim Nutr Health, 1974. **29**: p. 4-8.
211. Fuller, R., *Probiotics in man and animals*. Journal of Applied Bacteriology, 1989. **66**(5): p. 365-378.
212. Havenaar, R. and J.H.J. Huis, *Probiotics: a general view*, in *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*. 1992, Springer. p. 151-170.
213. Guarner, F. and G.J. Schaafsma, *Probiotics*. International Journal of Food Microbiology, 1998. **39**(3): p. 237-238.
214. Tannock, G.W., K. Munro, H.J.M. Harmsen, G.W. Welling, J. Smart, and P.K. Gopal, *Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosus DR20*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(6): p. 2578-2588.
215. Schrezenmeir, J. and M. de Vrese, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001. **73**(2): p. 361s-364s.
216. FAO/WHO, *Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada, 2002. **30**.
217. Zhang, L., N. Li, R. Caicedo, and J. Neu, *Alive and dead Lactobacillus rhamnosus GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in caco-2 cells*. The Journal of Nutrition, 2005. **135**(7): p. 1752-1756.
218. McFarland, L.V., *Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of Clostridium difficile disease*. The American Journal of Gastroenterology, 2006. **101**(4): p. 812-822.
219. Saavedra, J.M., N.A. Bauman, J.A. Perman, R.H. Yolken, J.M. Saavedra, and I. Oung, *Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus*. The Lancet, 1994. **344**(8929): p. 1046-1049.

220. Niedzielin, K., H. Kordecki, and B. ena Birkenfeld, *A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum 299V in patients with irritable bowel syndrome*. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2001. **13**(10): p. 1143-1147.
221. Mack, D.R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall, and M.A. Hollingsworth, *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1999. **276**(4): p. G941-G950.
222. Madsen, K., A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jijon, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell, and C. De Simone, *Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 580-591.
223. Otte, J.-M. and D.K. Podolsky, *Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2004. **286**(4): p. G613-G626.
224. Petrof, E.O., K. Kojima, M.J. Ropeleski, M.W. Musch, Y. Tao, C. De Simone, and E.B. Chang, *Probiotics inhibit nuclear factor- κ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition*. Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. 1474-1487.
225. Ma, D., P. Forsythe, and J. Bienenstock, *Live Lactobacillus reuteri is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression*. Infection and Immunity, 2004. **72**(9): p. 5308-5314.
226. Kamada, N., K. Maeda, N. Inoue, T. Hisamatsu, S. Okamoto, K.S. Hong, T. Yamada, N. Watanabe, K. Tsuchimoto, and H. Ogata, *Nonpathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells*. Infection and Immunity, 2008. **76**(1): p. 214-220.
227. Kaila, M., E. Isolauri, E. Soppi, E. Virtanen, S. Laine, and H. Arvilommi, *Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain*. Pediatr Res, 1992. **32**(2): p. 141-144.
228. Link-Amster, H., F. Rochat, K.Y. Saudan, O. Mignot, and J.M. Aeschlimann, *Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1994. **10**(1): p. 55-63.
229. Schiffrin, E.J., D. Brassart, A.L. Servin, F. Rochat, and A. Donnet-Hughes, *Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1997. **66**(2): p. 515S-520S.
230. Rinne, M., M. Kalliomaki, H. Arvilommi, S. Salminen, and E. Isolauri, *Effect of probiotics and breastfeeding on the Bifidobacterium and Lactobacillus/Enterococcus microbiota and humoral immune responses*. The Journal of Pediatrics, 2005. **147**(2): p. 186-191.
231. Rautava, S., H. Arvilommi, and E. Isolauri, *Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants*. Pediatric Research, 2006. **60**(2): p. 221-224.
232. Mondel, M., B.O. Schroeder, K. Zimmermann, H. Huber, S. Nuding, J. Beisner, K. Fellermann, E.F. Stange, and J. Wehkamp, *Probiotic E. coli treatment mediates antimicrobial human-defensin synthesis and fecal excretion in humans*. 2008.

233. Schlee, M., J. Harder, B. Köten, E.F. Stange, J. Wehkamp, and K. Fellermann, *Probiotic lactobacilli and VSL# 3 induce enterocyte β -defensin 2*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2008. **151**(3): p. 528-535.
234. Sonnenburg, J.L., C.T.L. Chen, and J.I. Gordon, *Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host*. *PLOS Biology*, 2006. **4**(12): p. e413.
235. Lee, Y.-K. and K.-Y. Puong, *Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate*. *British Journal of Nutrition*, 2002. **88**(S1): p. S101-S108.
236. Asahara, T., K. Shimizu, K. Nomoto, T. Hamabata, A. Ozawa, and Y. Takeda, *Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7*. *Infection and Immunity*, 2004. **72**(4): p. 2240-2247.
237. Castagliuolo, I., J.T. LaMont, S.T. Nikulasson, and C. Pothoulakis, *Saccharomyces boulardii protease inhibits Clostridium difficile toxin A effects in the rat ileum*. *Infection and Immunity*, 1996. **64**(12): p. 5225-5232.
238. Fliss, I., R. Hammami, and C. Le Lay, *Biological control of human digestive microbiota using antimicrobial cultures and bacteriocins*. *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Woodhead Publ Ltd, Abington Hall Abington, Cambridge Cb1 6ah, Cambs, UK, 2011: p. 240-263.
239. Servin, A.L., *Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004. **28**(4): p. 405-440.
240. Makras, L., V. Triantafyllou, D. Fayol-Messaoudi, T. Adriany, G. Zoumpopoulou, E. Tsakalidou, A.L. Servin, and L. De Vuyst, *Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds*. *Research in Microbiology*, 2006. **157**(3): p. 241-247.
241. Pridmore, R.D., A.-C. Pittet, F. Praplan, and C. Cavadini, *Hydrogen peroxide production by Lactobacillus johnsonii NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008. **283**(2): p. 210-215.
242. Ouwehand, A.C. and S. Vesterlund, *Antimicrobial components from lactic acid bacteria*, in *Food science and technology*. 2004. p. 375-396.
243. Riley, M.A. and J.E. Wertz, *Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives*. *Biochimie*, 2002. **84**(5): p. 357-364.
244. Majeed, H., O. Gillor, B. Kerr, and M.A. Riley, *Competitive interactions in Escherichia coli populations: the role of bacteriocins*. *The ISME Journal*, 2010. **5**(1): p. 71-81.
245. Meijerink, M., S. Van Hemert, N. Taverne, M. Wels, P. de Vos, P.A. Bron, H.F. Savelkoul, J. van Bilsen, M. Kleerebezem, and J.M. Wells, *Identification of genetic loci in Lactobacillus plantarum that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(5): p. e10632.
246. Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker, *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. *Bacteriological Reviews*, 1976. **40**(3): p. 722-756.
247. Rea, M.C., R.P. Ross, P.D. Cotter, and C. Hill, *Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria*, in *Prokaryotic antimicrobial peptides*. 2011, Springer. p. 29-53.

248. Rebuffat, S., *Bacteriocins from Gram-negative bacteria: a classification?*, in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. 2011, Springer. p. 55-72.
249. Rebuffat, S., *Microcins from enterobacteria: on the edge between Gram-positive bacteriocins and colicins*, in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. 2011, Springer. p. 333-349.
250. Severinov, K., E. Semenova, and T. Kazakov, *Class I microcins: their structures, activities, and mechanisms of resistance*, in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. 2011, Springer. p. 289-308.
251. Vassiliadis, G., D. Destoumieux-Garzón, and J. Peduzzi, *Class II microcins*, in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. 2011, Springer. p. 309-332.
252. Arnison, P.G., M.J. Bibb, G. Bierbaum, A.A. Bowers, T.S. Bugni, G. Bulaj, J.A. Camarero, D.J. Campopiano, G.L. Challis, J. Clardy, P.D. Cotter, D.J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P.C. Dorrestein, K.-D. Entian, M.A. Fischbach, J.S. Garavelli, U. Goransson, C.W. Gruber, D.H. Haft, T.K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A.R. Horswill, M. Jaspars, W.L. Kelly, J.P. Kilnman, O.P. Kuijper, A.J. Link, W. Liu, M.A. Marahiel, D.A. Mitchell, G.N. Moll, B.S. Moore, R. Müller, S.K. Nair, I.F. Nes, G.E. Norris, B.M. Olivera, H. Onaka, M.L. Patchett, J. Piel, M.J.T. Reaney, S. Rebuffat, P. Ross, H.-G. Sahl, E.W. Schmidt, M.E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L. Smith, T. Stein, R.D. Süßmuth, J.R. Tagg, G.-L. Tang, A.W. Truman, J.C. Vederas, C.T. Walsh, J.D. Walton, S.C. Wenzel, J.M. Willey, and W.A. Van der Donk, *Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature*. Natural Product Reports, 2013. **30**(1): p. 108-160.
253. Klaenhammer, T.R., *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 1993. **12**(1-3): p. 39-85.
254. Willey, J.M. and W.A. van Der Donk, *Lantibiotics: peptides of diverse structure and function*. Annu. Rev. Microbiol., 2007. **61**: p. 477-501.
255. Bierbaum, G. and H.-G. Sahl, *Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2009. **10**(1): p. 2-18.
256. Meindl, K., T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, H. Gühring, L. Vértesy, J. Wink, and H. Hoffmann, *Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(6): p. 1151-1154.
257. Kawulka, K., T. Sprules, R.T. McKay, P. Mercier, C.M. Diaper, P. Zuber, and J.C. Vederas, *Structure of subtilosin A, an antimicrobial peptide from Bacillus subtilis with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to α -carbons of phenylalanine and threonine*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(16): p. 4726-4727.
258. Rea, M.C., C.S. Sit, E. Clayton, P.M. O'Connor, R.M. Whittal, J. Zheng, J.C. Vederas, R.P. Ross, and C. Hill, *Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against Clostridium difficile*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(20): p. 9352-9357.
259. Nissen-Meyer, J., P. Rogne, C. Oppegard, H.S. Haugen, and P.E. Kristiansen, *Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2009. **10**(1): p. 19-37.

260. Simon, L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo, and J.M. Berjeaud, *Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(12): p. 6416-6420.
261. Tahara, T., M. Oshimura, C. Umezawa, and K. Kanatani, *Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus JCM 1132*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(3): p. 892-897.
262. Papagianni, M. and S. Anastasiadou, *Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications*. Microbial Cell Factories, 2009. **8**(1): p. 3.
263. Belguesmia, Y., K. Naghmouchi, N.-E. Chihib, and D. Drider, *Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives*, in *Prokaryotic antimicrobial peptides*. 2011, Springer. p. 171-195.
264. Jiménez-Díaz, R., J.L. Ruiz-Barba, D.P. Cathcart, H. Holo, I.F. Nes, K.H. Sletten, and P.J. Warner, *Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(12): p. 4459-4463.
265. Vaughan, A., V.G.H. Eijsink, T.F. O'Sullivan, K. O'Hanlon, and D. Van Sinderen, *An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **91**(1): p. 131-138.
266. Oppegård, C., P. Rogne, L. Emanuelsen, P.E. Kristiansen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer, *The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007. **13**(4): p. 210-219.
267. Maqueda, M., M. Sánchez-Hidalgo, M. Fernández, M. Montalbán-López, E. Valdivia, and M. Martínez-Bueno, *Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**(1): p. 2-22.
268. Sahl, H.-G., M. Kordel, and R. Benz, *Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin*. Archives of Microbiology, 1987. **149**(2): p. 120-124.
269. Kuipers, A., R. Rink, and G.N. Moll, *Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics*, in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. 2011, Springer. p. 147-169.
270. Chikindas, M.L., M.J. García-Garcerá, A.J. Driessen, A.M. Ledebøer, J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, T. Abee, W.N. Konings, and G. Venema, *Pediocin PA-1, a bacteriocin from Pediococcus acidilactici PAC1. 0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(11): p. 3577-3584.
271. Herranz, C., Y. Chen, H.-J. Chung, L.M. Cintas, P.E. Hernandez, T.J. Montville, and M.L. Chikindas, *Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of Enterococcus faecium T136*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(4): p. 1689-1692.
272. Kazazic, M., J. Nissen-Meyer, and G. Fimland, *Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P*. Microbiology, 2002. **148**(7): p. 2019-2027.

273. Lai, A.C.-Y., S. Tran, and R.S. Simmonds, *Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. FEMS Microbiology Letters, 2002. **215**(1): p. 133-138.
274. Mulders, J.W.M., I.J. Boerrigter, H.S. Rollema, R.J. Siezen, and W.M. de Vos, *Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant*. European Journal of Biochemistry, 1991. **201**(3): p. 581-584.
275. Fukao, M., T. Obita, F. Yoneyama, D. Kohda, T. Zendo, J. Nakayama, and K. Sonomoto, *Complete covalent structure of nisin Q, new natural nisin variant, containing post-translationally modified amino acids*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008. **72**(7): p. 1750-1755.
276. Hooven, H.W., C. Doeland, M. Kamp, R.N.H. Konings, C.W. Hilbers, and F.J.M. Ven, *Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate*. European Journal of Biochemistry, 1996. **235**(1-2): p. 382-393.
277. Van der Meer, J.R., J. Polman, M.M. Beerthuyzen, R.J. Siezen, O.P. Kuipers, and W.M. De Vos, *Characterization of the Lactococcus lactis nisin A operon genes nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis*. Journal of Bacteriology, 1993. **175**(9): p. 2578-2588.
278. Cheigh, C.I. and Y.R. Pyun, *Nisin biosynthesis and its properties*. Biotechnology Letters, 2005. **27**(21): p. 1641-1648.
279. Oman, T.J. and W.A. van der Donk, *Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin*. ACS Chemical Biology, 2009. **4**(10): p. 865-874.
280. Piper, C., L.A. Draper, P.D. Cotter, R.P. Ross, and C. Hill, *A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant Staphylococcus aureus and Enterococcus species*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009. **64**(3): p. 546-551.
281. Piper, C., C. Hill, P.D. Cotter, and R.P. Ross, *Bioengineering of a Nisin A-producing Lactococcus lactis to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z*. Microbial Biotechnology, 2010. **4**(3): p. 375-382.
282. Rea, M.C., E. Clayton, P.M. O'Connor, F. Shanahan, B. Kiely, R.P. Ross, and C. Hill, *Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical Clostridium difficile strains*. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**(7): p. 940-946.
283. Corr, S.C., Y. Li, C.U. Riedel, P.W. O'Toole, C. Hill, and C.G.M. Gahan, *Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of Lactobacillus salivarius UCC118*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(18): p. 7617-7621.
284. Millette, M., G. Cornut, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault, and M. Lacroix, *Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(7): p. 1997-2003.
285. Dobson, A., F. Crispie, M.C. Rea, O. O'Sullivan, P.G. Casey, P.G. Lawlor, P.D. Cotter, P. Ross, G.E. Gardiner, and C. Hill, *Fate and efficacy of lacticin 3147-producing Lactococcus lactis in the mammalian gastrointestinal tract*. FEMS microbiology ecology, 2011. **76**(3): p. 602-614.

286. Piper, C., P.G. Casey, C. Hill, P.D. Cotter, and R.P. Ross, *The lantibiotic lacticin 3147 prevents systemic spread of Staphylococcus aureus in a murine infection model*. International Journal of Microbiology, 2012. **2012**.
287. Brand, A.M., M. De Kwaadsteniet, and L.M.T. Dicks, *The ability of nisin F to control Staphylococcus aureus infection in the peritoneal cavity, as studied in mice*. Letters in Applied Microbiology, 2010. **51**(6): p. 645-649.
288. De Kwaadsteniet, M., K. Ten Doeschate, and L.M.T. Dicks, *Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a Lactococcus lactis subsp. lactis isolate from freshwater catfish (Clarias gariepinus)*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(2): p. 547-549.
289. Dabour, N., A. Zihler, E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss, *In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and Pediococcus acidilactici UL5 at inhibiting Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 2009. **133**(3): p. 225-233.
290. Salvucci, E., L. Saavedra, E.M. Hebert, C. Haro, and F. Sesma, *Enterocin CRL35 inhibits Listeria monocytogenes in a murine model*. Foodborne Pathogens and Disease, 2012. **9**(1): p. 68-74.
291. Kelly, C.P. and J.T. LaMont, *Clostridium difficile — More difficult than ever*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(18): p. 1932-1940.
292. Rupnik, M., M.H. Wilcox, and D.N. Gerding, *Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis*. Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(7): p. 526-536.
293. Stanley, J.D., J.G. Bartlett, B.W.t. Dart, and J.H. Ashcraft, *Clostridium difficile infection*. Current problems in surgery, 2013. **50**(7): p. 302-337.
294. Sorg, J.A. and A.L. Sonenshein, *Bile salts and glycine as cogerminants for Clostridium difficile spores*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(7): p. 2505-2512.
295. Slimings, C. and T.V. Riley, *Antibiotics and hospital-acquired Clostridium difficile infection: update of systematic review and meta-analysis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014. **69**(4): p. 881-891.
296. Wiström, J., S.R. Norrby, E.B. Myhre, S. Eriksson, G. Granström, L. Lagergren, G. Englund, C.E. Nord, and B. Svenungsson, *Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. **47**(1): p. 43-50.
297. Surawicz, C.M., L.J. Brandt, D.G. Binion, A.N. Ananthakrishnan, S.R. Curry, P.H. Gilligan, L.V. McFarland, M. Mellow, and B.S. Zuckerbraun, *Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections*. The American journal of gastroenterology, 2013. **108**(4): p. 478-498.
298. Baines, S.D., R. O'Connor, J. Freeman, W.N. Fawley, C. Harmanus, P. Mastrantonio, E.J. Kuijper, and M.H. Wilcox, *Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in Clostridium difficile*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008. **62**(5): p. 1046-1052.
299. Hammami, R., B. Fernandez, C. Lacroix, and I. Fliss, *Anti-infective properties of bacteriocins: an update*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(16): p. 2947-67.
300. Drider, D. and S. Rebuffat, *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. 2011: Springer Science & Business Media.

301. McAuliffe, O., M.P. Ryan, R.P. Ross, C. Hill, P. Breeuwer, and T. Abee, *Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(2): p. 439-445.
302. Breukink, E. and B. de Kruijff, *The lantibiotic nisin, a special case or not?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999. **1462**(1-2): p. 223-234.
303. Ávila, M., N. Gómez-Torres, M. Hernández, and S. Garde, *Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related Clostridium species*. International Journal of Food Microbiology, 2014. **172**: p. 70-75.
304. Lakshminarayanan, B., C.M. Guinane, P.M. O'Connor, M. Coakley, C. Hill, C. Stanton, P.W. O'Toole, and R.P. Ross, *Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the intestinal microbiota of elderly Irish subjects*. Journal of Applied Microbiology, 2013. **114**(3): p. 886-898.
305. Bartoloni, A., A. Mantella, B.P. Goldstein, R. Dei, M. Benedetti, S. Sbaragli, and F. Paradisi, *In-vitro activity of nisin against clinical isolates of Clostridium difficile*. Journal of chemotherapy, 2004. **16**(2): p. 119-121.
306. Field, D., L. Quigley, P.M. O'Connor, M.C. Rea, K. Daly, P.D. Cotter, C. Hill, and R.P. Ross, *Studies with bioengineered Nisin peptides highlight the broad-spectrum potency of Nisin V*. Microbial biotechnology, 2010. **3**(4): p. 473-486.
307. Ali, D., C. Lacroix, R.E. Simard, D. Thuault, and C.M. Bourgeois, *Characterization of diacetin B, a bacteriocin from Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis UL720*. Canadian journal of microbiology, 1995. **41**(9): p. 832-841.
308. Meghrous, J., C. Lacroix, M. Bouksaïm, G. LaPointe, and R.E. Simard, *Note: Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis UL 719*. Journal of Applied Microbiology, 1997. **83**(2): p. 133-138.
309. Bouksaim, M., I. Fliss, J. Meghrous, R.E. Simard, and C. Lacroix, *Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence*. Journal of Applied Microbiology, 1998. **84**(2): p. 176-184.
310. Le Lay, C., B. Akerey, I. Fliss, M. Subirade, and M. Rouabhia, *Nisin Z inhibits the growth of Candida albicans and its transition from blastospore to hyphal form*. Journal of Applied Microbiology, 2008. **105**(5): p. 1630-1639.
311. Mota-Meira, M., G. Lapointe, C. Lacroix, and M.C. Lavoie, *MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. **44**(1): p. 24-29.
312. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria*. 2007, CLSI, Wayne, PA, USA.
313. Mutlu, E., A.J. Wroe, K. Sanchez-Hurtado, J.S. Brazier, and I.R. Poxton, *Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of Clostridium difficile strains isolated from hospitals in south-east Scotland*. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**(7): p. 921-929.
314. Paredes-Sabja, D., C. Bond, R.J. Carman, P. Setlow, and M.R. Sarker, *Germination of spores of Clostridium difficile strains, including isolates from a hospital outbreak of Clostridium difficile-associated disease (CDAD)*. Microbiology, 2008. **154**(8): p. 2241-2250.

315. Mulders, J.W.M., I.J. Boerrigter, H.S. ROLLEMA, R.J. SIEZEN, and W.M. VOS, *Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant*. European Journal of Biochemistry, 1991. **201**(3): p. 581-584.
316. Mathur, H., P.M. O'Connor, C. Hill, P.D. Cotter, and R.P. Ross, *Analysis of anti-Clostridium difficile activity of thuricin CD, vancomycin, metronidazole, ramoplanin, and actagardine, both singly and in paired combinations*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013. **57**(6): p. 2882-2886.
317. Drummond, L.J., J. McCoubrey, D.G.E. Smith, J.M. Starr, and I.R. Poxton, *Changes in sensitivity patterns to selected antibiotics in Clostridium difficile in geriatric in-patients over an 18-month period*. Journal of Medical Microbiology, 2003. **52**(3): p. 259-263.
318. Wilson, K.H. and F. Perini, *Role of competition for nutrients in suppression of Clostridium difficile by the colonic microflora*. Infection and Immunity, 1988. **56**(10): p. 2610-2614.
319. Nerandzic, M.M. and C.J. Donskey, *Activate to eradicate: inhibition of Clostridium difficile spore outgrowth by the synergistic effects of osmotic activation and nisin*. PLOS One, 2013. **8**(1).
320. Martinez-Cuesta, M.C., J. Bengoechea, I. Bustos, B. Rodriguez, T. Requena, and C. Pelaez, *Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing Lactococcus lactis IFPL 3593 to the starter*. International Dairy Journal, 2010. **20**(1): p. 18-24.
321. Abriouel, H., M. Maqueda, A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, and E. Valdivia, *Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of Bacillus cereus by bacteriocin AS-48*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(3): p. 1473-1477.
322. Pol, I.E., W.G.C. van Arendonk, H.C. Mastwijk, J. Krommer, E.J. Smid, and R. Moezelaar, *Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of Bacillus cereus to nisin and pulsed-electric-field treatment*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(4): p. 1693-1699.
323. Gut, I.M., S.R. Blanke, and W.A. van der Donk, *Mechanism of Inhibition of Bacillus anthracis spore outgrowth by the lantibiotic nisin*. ACS Chemical Biology, 2011. **6**(7): p. 744-752.
324. Gut, I.M., A.M. Prouty, J.D. Ballard, W.A. van der Donk, and S.R. Blanke, *Inhibition of Bacillus anthracis spore outgrowth by nisin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008. **52**(12): p. 4281-4288.
325. Ruhr, E. and H.G. Sahl, *Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1985. **27**(5): p. 841-845.
326. Wiedemann, I., E. Breukink, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff, and H.G. Sahl, *Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(3): p. 1772-1779.
327. Ouwehand, A.C., S. Salminen, and E. Isolauri, *Probiotics: an overview of beneficial effects*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002. **82**(1-4): p. 279-289.
328. Hammami, R., B. Fernandez, C. Lacroix, and I. Fliss, *Anti-infective properties of bacteriocins: an update*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013. **70**(16): p. 2947-2967.

329. Yan, F. and D.B. Polk, *Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2006. **9**(6): p. 717-721.
330. McFarland, L.V., *Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea*. Travel Medicine and Infectious Disease, 2007. **5**(2): p. 97-105.
331. Rowland, I.R., L. Capurso, K. Collins, J. Cummings, N. Delzenne, O. Goulet, F. Guarner, P. Marteau, and R. Meier, *Current level of consensus on probiotic science- Report of an expert meeting- London, 23 November 2009*. Gut Microbes, 2010. **1**(6): p. 436-439.
332. Carr, F.J., D. Chill, and M. Maida, *The lactic acid bacteria: a literature survey*. Critical Reviews in Microbiology, 2002. **28**(4): p. 281-370.
333. Roos, K. and S. Holm, *The use of probiotics in head and neck infections*. Current Infectious Disease Reports, 2002. **4**: p. 211-216.
334. Eschenbach, D.A., P.R. Davick, B.L. Williams, S.J. Klebanoff, K. Young-Smith, C.M. Critchlow, and K.K. Holmes, *Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis*. Journal of Clinical Microbiology, 1989. **27**(2): p. 251-256.
335. Tagg, J.R. and K.P. Dierksen, *Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention*. Trends in Biotechnology, 2003. **21**(5): p. 217-223.
336. Hammami, R., A. Zouhir, J.B. Hamida, and I. Fliss, *BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization*. BMC Microbiology, 2007. **7**(1): p. 89.
337. Hammami, R., A. Zouhir, C. Le Lay, J.B. Hamida, and I. Fliss, *BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization*. BMC Microbiology, 2010. **10**(1): p. 22.
338. Pieterse, R. and S.D. Todorov, *Bacteriocins: exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment*. Brazilian Journal of Microbiology, 2010. **41**(3): p. 542-562.
339. Dobson, A., P.D. Cotter, R.P. Ross, and C. Hill, *Bacteriocin production: a probiotic trait?* Applied and Environmental Microbiology, 2012. **78**(1): p. 1-6.
340. Garcera, M.J.G., M.G.L. Elferink, A.J.M. Driessen, and W.N. Konings, *In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin*. European Journal of Biochemistry, 1993. **212**(2): p. 417-422.
341. Breukink, E., I. Wiedemann, C. Van Kraaij, O.P. Kuipers, H.G. Sahl, and B. De Kruijff, *Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic*. Science, 1999. **286**(5448): p. 2361-2364.
342. van Heusden, H.E., B. de Kruijff, and E. Breukink, *Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin*. Biochemistry, 2002. **41**(40): p. 12171-12178.
343. Severina, E., A. Severin, and A. Tomasz, *Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998. **41**(3): p. 341-347.
344. Kheadr, E., A. Zihler, N. Dabour, C. Lacroix, G. Le Blay, and I. Fliss, *Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic in vitro model*. Journal of Applied Microbiology, 2010. **109**(1): p. 54-64.
345. Fernandez, B., R. Hammami, P. Savard, J. Jean, and I. Fliss, *Pediococcus acidilactici UL5 and Lactococcus lactis ATCC 11454 are able to survive and express their*

- bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions*. Journal of Applied Microbiology, 2014. **116**(3): p. 677-688.
346. Djae, A., C. Lacroix, R.E. Simard, D. Thuault, and C.M. Bourgeois, *Characterization of diacetin B, a bacteriocin from Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis UL720*. Canadian Journal of Microbiology, 1995. **41**(9): p. 832-841.
 347. De Man, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe, *A medium for the cultivation of Lactobacilli* Journal of Applied Bacteriology, 1960. **23**(1): p. 130-135.
 348. Minekus, M., P. Marteau, R. Havenaar, and J.H.J. Huis In't Veld, *A multi-compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine*. ATLA. Alternatives to Laboratory Animals, 1995. **23**(2): p. 197-209.
 349. Marteau, P., B. Flourie, P. Pochart, C. Chastang, J.F. Desjeux, and J.C. Rambaud, *Effect of the microbial lactase (EC 3.2. 1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans*. British Journal of Nutrition, 1990. **64**(01): p. 71-79.
 350. Marteau, P., P. Pochart, S. Mahé, L. Crine, J.F. Huneau, D. Tomé, and J.C. Rambaud, *Gastric emptying but not orocecal transit time differs between milk and yoghurt in lactose digesters*. Gastroenterology, 1991. **100**: p. A535.
 351. Kailasapathy, K., *Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt*. LWT-Food Science and Technology, 2006. **39**(10): p. 1221-1227.
 352. Marteau, P., M. Minekus, R. Havenaar, and J.H.J. Huis In't Veld, *Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile*. Journal of dairy science, 1997. **80**(6): p. 1031-1037.
 353. Blanquet, S., R. Antonelli, L. Laforet, S. Denis, S. Marol-Bonnin, and M. Alric, *Living recombinant Saccharomyces cerevisiae secreting proteins or peptides as a new drug delivery system in the gut*. Journal of Biotechnology, 2004. **110**(1): p. 37-49.
 354. Larsson, M., M. Minekus, and R. Havenaar, *Estimation of the bioavailability of iron and phosphorus in cereals using a dynamic in vitro gastrointestinal model*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1997. **74**(1): p. 99-106.
 355. Verwei, M., K. Arkbåge, R. Havenaar, H. van den Berg, C. Witthöft, and G. Schaafsma, *Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model*. The Journal of Nutrition, 2003. **133**(7): p. 2377-2383.
 356. Krul, C., C. Humblot, C. Philippe, M. Vermeulen, M. van Nuenen, R. Havenaar, and S. Rabot, *Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model*. Carcinogenesis, 2002. **23**(6): p. 1009-1016.
 357. Hofmann, A.F., *Bile acids: the good, the bad, and the ugly*. Physiology, 1999. **14**(1): p. 24-29.
 358. Marteau, P., M. Minekus, R. Havenaar, and J.H.J. Huis, *Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile*. Journal of Dairy Science, 1997. **80**(6): p. 1031-1037.
 359. Gänzle, M.G., C. Hertel, J.M.B.M. van der Vossen, and W.P. Hammes, *Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of Escherichia coli and Listeria in a dynamic model of the stomach and the small intestine*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **48**(1): p. 21-35.

360. Drouault, S., G. Corthier, S.D. Ehrlich, and P. Renault, *Survival, physiology, and lysis of Lactococcus lactis in the digestive tract*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(11): p. 4881-4886.
361. Kim, W.S., J. Ren, and N.W. Dunn, *Differentiation of Lactococcus lactis subspecies lactis and subspecies cremoris strains by their adaptive response to stresses*. FEMS Microbiology Letters, 1999. **171**(1): p. 57-65.
362. Pochart, P., P. Marteau, Y. Bouhnik, I. Goderel, P. Bourlioux, and J.C. Rambaud, *Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1992. **55**(1): p. 78-80.
363. Klijn, N., A.H. Weerkamp, and W.M. De Vos, *Genetic marking of Lactococcus lactis shows its survival in the human gastrointestinal tract*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(7): p. 2771-2774.
364. Rodriguez, J.M., M.I. Martinez, and J. Kok, *Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2002. **42**(2): p. 91-121.
365. Horn, N., S. Swindell, H. Dodd, and M. Gasson, *Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon*. Molecular and General Genetics MGG, 1991. **228**(1-2): p. 129-135.
366. Rollema, H.S., O.P. Kuipers, P. Both, W.M. De Vos, and R.J. Siezen, *Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(8): p. 2873-2878.
367. Heinemann, B. and R. Williams, *Inactivation of nisin by pancreatin*. Journal of Dairy Science, 1966. **49**(3): p. 312-314.
368. Gardiner, G.E., M.C. Rea, B. O'Riordan, P.M. O'Connor, S.M. Morgan, P.G. Lawlor, P.B. Lynch, M. Cronin, R.P. Ross, and C. Hill, *Fate of the two-component lantibiotic lactacin 3147 in the gastrointestinal tract*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(21): p. 7103-7109.
369. Fernandez, B., C. Le Lay, J. Jean, and I. Fliss, *Growth, acid production and bacteriocin production by probiotic candidates under simulated colonic conditions*. Journal of Applied Microbiology, 2013. **114**(3): p. 877-885.
370. Borriello, S.P., H.A. Davies, S. Kamiya, P.J. Reed, and S. Seddon, *Virulence factors of Clostridium difficile*. Review of Infectious Diseases, 1990. **12**(Supplement 2): p. S185-S191.
371. Surowiec, D., A.G. Kuyumjian, M.A. Wynd, and C.E. Cicogna, *Past, present, and future therapies for Clostridium difficile-associated disease*. The Annals of Pharmacotherapy, 2006. **40**(12): p. 2155-2163.
372. Lagrotteria, D., S. Holmes, M. Smieja, F. Smaill, and C. Lee, *Prospective, randomized inpatient study of oral metronidazole versus oral metronidazole and rifampin for treatment of primary episode of Clostridium difficile-associated diarrhea*. Clinical Infectious Diseases, 2006. **43**(5): p. 547-552.
373. Guandalini, S., *Probiotics for prevention and treatment of diarrhea*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2011. **45**: p. S149-S153
374. Fox, M.J., K.D.K. Ahuja, I.K. Robertson, M.J. Ball, and R.D. Eri, *Can probiotic yogurt prevent diarrhoea in children on antibiotics? A double-blind, randomised, placebo-controlled study*. BMJ Open, 2015. **5**(1): p. e006474.

375. McFarland, L., *Probiotics for the Primary and Secondary Prevention of C. difficile Infections: A Meta-analysis and Systematic Review*. *Antibiotics*, 2015. **4**(2): p. 160.
376. Le Lay, C., L. Dridi, M.G. Bergeron, M. Ouellette, and I. Fliss, *Nisin is an effective inhibitor of Clostridium difficile vegetative cells and spore germination*. *Journal of Medical Microbiology*, 2015: p. (submitted).
377. Castiglione, F., A. Lazzarini, L. Carrano, E. Corti, I. Ciciliato, L. Gastaldo, P. Candiani, D. Losi, F. Marinelli, and E. Selva, *Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens*. *Chemistry & Biology*, 2008. **15**(1): p. 22-31.
378. Delves-Broughton, J., *Nisin and its application as a food preservative*. *International Journal of Dairy Technology*, 1990. **43**(3): p. 73-76.
379. Ali, D., C. Lacroix, D. Thuault, C.M. Bourgeois, and R.E. Simard, *Characterization of diacetin B, a bacteriocin from Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis UL720*. *Can J Microbiol*, 1995. **41**(9): p. 832-41.
380. Gibson, G.R. and X. Wang, *Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture*. *FEMS Microbiology Letters*, 1994. **118**(1-2): p. 121-127.
381. Fernandez, B., P. Savard, and I. Fliss, *Survival and metabolic activity of pediocin producer Pediococcus acidilactici UL5: its impact on intestinal microbiota and Listeria monocytogenes in a model of the human terminal ileum*. *Microbial Ecology*, 2015: p. accepted.
382. Ahlroos, T. and S. Tynkkynen, *Quantitative strain-specific detection of Lactobacillus rhamnosus GG in human faecal samples by real-time PCR*. *Journal of Applied Microbiology*, 2009. **106**(2): p. 506-514.
383. Hopkins, M.J., G.T. Macfarlane, E. Furrer, A. Fite, and S. Macfarlane, *Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005. **54**(1): p. 77-85.
384. Kanno, T., T. Matsuki, M. Oka, H. Utsunomiya, K. Inada, H. Magari, I. Inoue, T. Maekita, K. Ueda, S. Enomoto, M. Iguchi, K. Yanaoka, H. Tamai, S. Akimoto, K. Nomoto, R. Tanaka, and M. Ichinose, *Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. **381**(4): p. 666-670.
385. Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu, and R. Tanaka, *Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68**(11): p. 5445-5451.
386. Rinttilä, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Kroggius, and A. Palva, *Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR*. *Journal of Applied Microbiology*, 2004. **97**(6): p. 1166-1177.
387. Huijsdens, X.W., R.K. Linskens, M. Mak, S.G.M. Meuwissen, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, and P.H.M. Savelkoul, *Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002. **40**(12): p. 4423-4427.

388. Trmčić, A., C. Monnet, I. Rogelj, and B.B. Matijašić, *Expression of nisin genes in cheese—a quantitative real-time polymerase chain reaction approach*. Journal of dairy science, 2011. **94**(1): p. 77-85.
389. Brück, W.M., G. Graverholt, and G.R. Gibson, *Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria*. FEMS Microbiology Ecology, 2002. **41**(3): p. 231-237.
390. Cleusix, V., C. Lacroix, S. Vollenweider, and G. Le Blay, *Glycerol induces reuterin production and decreases Escherichia coli population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces*. FEMS Microbiology Ecology, 2008. **63**(1): p. 56-64.
391. Probert, H.M. and G.R. Gibson, *Development of a fermentation system to model sessile bacterial populations in the human colon*. Biofilms, 2004. **1**(01): p. 13-19.
392. Franks, A.H., H.J.M. Harmsen, G.C. Raangs, G.J. Jansen, F. Schut, and G.W. Welling, *Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(9): p. 3336-3345.
393. Harmsen, H.J.M., P. Elfferich, F. Schut, and G. Welling, *A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization*. Microbial Ecology in Health and Disease, 1999. **11**(1): p. 3-12.
394. Antonopoulos, D.A., S.M. Huse, H.G. Morrison, T.M. Schmidt, M.L. Sogin, and V.B. Young, *Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation*. Infection and immunity, 2009. **77**(6): p. 2367-2375.
395. Nocker, A., C.Y. Cheung, and A.K. Camper, *Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells*. Journal of Microbiological Methods, 2006. **67**(2): p. 310-320.