



Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à *Staphylococcus aureus*

Damien Bouchard

► To cite this version:

Damien Bouchard. Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à *Staphylococcus aureus*. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2013. Français. ⟨NNT: 2013REN1S098⟩. ⟨tel-01397499⟩

HAL Id: tel-01397499

<https://theses.hal.science/tel-01397499v1>

Submitted on 16 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale VAS

présentée par

Damien Bouchard

Préparée à l'unité de recherche UMR 1253 STLO
Sciences et Technologies du Lait et l'oeuf
INRA-AGROCAMPUS OUEST

**Potentiel probiotique
des bactéries lactiques
de l'écosystème
mammaire bovin
contre les mammites à
*Staphylococcus aureus***

**Thèse soutenue à Rennes
le 14 Novembre 2013**

devant le jury composé de :

Michel Gautier

Professeur, Agrocampus Ouest, Rennes / Président

Monique Zagorec

Directrice de Recherche, INRA-ONIRIS, Nantes / Rapporteur

Frédéric Laurent

Maitre de conférence, Practicien Hospitalier, Université de Lyon /
Rapporteur

Fatima Nader-Macias

Directrice de Recherche, CERELA, Tùcùman / Examineur

Philippe Langella

Directeur de Recherche, INRA, Jouy-en-Josas / Examineur

Samer Kayal

Professeur et Practicien Hospitalier, Université de Rennes 1,
Rennes / Examineur

Yves Le Loir

Directeur de Recherche, INRA, Rennes / Directeur de thèse

Sergine Even

Chargée de Recherche, INRA, Rennes / Co-directrice de thèse

*A mes parents,
A mes frères,
A mon amour,
A ma grand-mère...*

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie grandement Joëlle LEONIL, directrice du STLO de m'avoir accueilli dans son unité de recherche. Je tiens à vous remercier tant pour la qualité scientifique mise à notre disposition que pour votre soutien tout au long de mes trois années de thèse.

C'est de tout cœur que je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse, à savoir Sergine EVEN et Yves LE LOIR, pour m'avoir encadré. Merci à vous deux, vous formez un duo d'encadrants exceptionnels. Merci pour votre disponibilité, votre bonne humeur et humour, votre sympathie et bien sûr vos grandes qualités scientifiques qui nous ont parfois entraînés sur des discussions philosophiques qui vont très certainement me manquer. Merci encore pour toute l'aide technique et manuscrite au quotidien. Un grand merci aussi pour votre soutien permanent à présenter mes travaux dans des congrès et journées scientifiques qui m'ont permis à la fois de voyager mais surtout de rencontrer de grands scientifiques de la scène internationale.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues du STLO qui ont touché de près ou de loin à mon projet de thèse. Une attention particulière aux membres de l'équipe administrative BISE, à Laurence Fauvel, Danielle Guilloux, Anne-Marie Renouard et Christophe Geneste pour leurs aides régulières. Merci aux membres du CIRM-BIA, à Marie-Noëlle Madec, Florence Valence-Bertel et Victoria Chuat pour leur disponibilité et leur appui tout au long de mon projet. Je souhaite remercier les des scientifiques du laboratoire, notamment Rachel Boutrou et Said Bouhallab, pour leur regard critique sur mon projet qui m'a permis de toujours affiner la démarche scientifique et en éclaircir le discours. Bien sûr mes remerciements vont à l'ensemble de l'équipe B2ISI à laquelle j'ai eu le plaisir d'appartenir, tant du côté clair que du côté obscur de la force. Un grand merci à Lucie Rault pour sa permanente bonne humeur, Paulette Amet et Jessica Musset pour leurs précieuses aides tout au long de mon projet ainsi que leur grande sympathie, à Gwenaël Jan, Nadia Berkova, Hélène Falentin, Stéphanie-Marie Deutsch, Anne Thierry, Sophie Jeanson et Sandrine Parayre avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler au quotidien.

Mes remerciements vont aussi au Dr Fatima Nader-Macias, pour son accueil au sein de son équipe de recherche du CERELA en Argentine où j'ai eu le plaisir de passer 1 mois.

Un grand merci pour cette expérience unique qui m'a permis de rencontrer de grands scientifiques mais aussi des camarades et visiter un pays magnifique. Muchas gracias por todo Fati, espero que nos vemos rapidamente.

Je tiens à remercier les membres de l'UMR PEGASE de l'INRA de Rennes ainsi que les agriculteurs du réseau InterBioBretagne pour leurs aides et leur sympathie tout au long des échantillonnages.

Bien sûr mes remerciements vont à tous mes collègues devenus camarades avec lesquels j'ai eu le plaisir de partager ces années. À François et Naaman pour tous les bons moments passés en votre compagnie, mais aussi à Vincent et Bianca pour le partage de paillasse, de café, de gâteaux... Je tiens également à remercier Taous, Rozenn, Clem, Gwénolé, Julianna, Xav, Hun, Coralie, Gui, Kéra et l'ensemble des stagiaires et doctorants qui ont partagé ces trois années avec les miennes.

Mes remerciements vont aussi à tous mes amis qui ont « parfois » subi mes longs monologues sur l'importance des bactéries sur Terre.

Merci à mon grand Amour qui a toujours été présente pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments.

Enfin, je tiens à remercier mes chers parents qui m'ont encouragé (merci maman) ou poussé (merci papa) à poursuivre mes études. Merci pour tous les sacrifices que vous avez dû faire pour notre éducation, j'espère que cela rembourse une partie de mon éternelle dette.

A tous, du fond du cœur, merci...

- SOMMAIRE -

Table des illustrations	: figures
Tables des illustrations	: tableaux
Abréviations	
Avant-propos	

CHAPITRE I : Introduction bibliographique

Partie A	: Introduction générale.....	19
Partie B	: Les mammites bovines.....	25
I.	Généralités.....	27
II.	La glande mammaire saine	27
a.	Les canaux galactophores.....	28
b.	La citerne de la glande mammaire	28
c.	Les trayons	28
d.	La cellule épithéliale mammaire	28
III.	Les protections naturelles de la glande mammaire	30
a.	Les défenses anatomiques	30
b.	Les défenses immunitaires	30
c.	L'immunité des cellules épithéliales	32
IV.	Le processus infectieux	33
V.	Le développement des mammites et leur typologie	33
VI.	Etiologie des mammites bovines	34
a.	Les pathogènes majeurs.....	35
b.	Les pathogènes mineurs	35
c.	Les pathogènes occasionnels.....	35
VII.	Bilan.....	36

Partie C	: Les mammites à <i>Staphylococcus aureus</i>	39
I.	<i>Staphylococcus aureus</i>	41
a.	Généralités.....	41
b.	Variabilité génomique	42
c.	Adaptation à l'hôte	43
II.	Problèmes sanitaires	46
III.	Origine de la contamination	47
IV.	Le cycle infectieux	47
a.	Adhésion de <i>S. aureus</i> aux cellules du tissu mammaire	48
b.	Internalisation de <i>S. aureus</i> aux cellules du tissu mammaire.....	50
c.	Vie intracellulaire de <i>S. aureus</i> et persistance intramammaire	51
i.	Effet cytopathique.....	51
ii.	Persistance intracellulaire et Small Colony Variant	53
iii.	Induction de la mort cellulaire.....	55
iv.	Formation de biofilm dans la glande mammaire	55
V.	Les facteurs de virulence associés à <i>S. aureus</i>	56
a.	Les MSCRAMMs : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules.....	56
b.	Les SERAMs : Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules	58
c.	Les toxines.....	59
d.	Les entérotoxines.....	59
VI.	La réponse immunitaire à <i>S. aureus</i> dans la glande mammaire	60
VII.	Stratégies de lutte contre les mammites	61

Partie D	: Le microbiote de la glande mammaire.....	65
I.	La notion de microbiote.....	67
II.	Le microbiote mammaire bovin.....	70
III.	Les bactéries lactiques dans les écosystèmes naturels	71
IV.	Potentiel probiotique et mécanismes d'action des bactéries lactiques	74
a.	Modulation de l'invasion et de la virulence	75
i.	Modulation de l'adhésion des bactéries pathogènes.....	75
ii.	Modulation de l'invasion des bactéries pathogènes	77
iii.	Modulation de la virulence des bactéries pathogènes.....	78
b.	Stimulation du système immunitaire.....	80
i.	Effets bénéfiques de l'activité immunomodulatrice	81
ii.	Effets bénéfiques sur l'immunité humorale.....	81
iii.	Effets bénéfiques sur les symptômes de l'allergie.....	82
iv.	Effets bénéfiques contre les infections bactériennes	82
v.	Effets bénéfiques sur l'intégrité de l'épithélium	83
Partie E	: Questions et stratégie de recherches.....	85
CHAPITRE II :	Lien entre variabilité et chronicité des souches de <i>S. aureus</i>	91
CHAPITRE III :	Diversité de la flore lactique mammaire et caractérisation de leur potentiel probiotique.....	135
CHAPITRE IV :	Inhibition de l'invasion de <i>S. aureus</i> par <i>L. casei</i>	165
CHAPITRE V :	Discussion générale, conclusions et perspectives.....	199
ANNEXES		217

Tables des illustrations : Figures

Chapitre I-A

Figure 1: Répartition des producteurs de lait de vache par région en 2011 (CNIEL 2013)

Figure 2: Nombre de vaches laitières et leur rendement en France (Agreste/CNIEL 2013)

Chapitre I-B

Figure 3: Structure générale de la mammelle (d'après Sandholm et al., 1990)

Figure 4: Schéma de la glande mammaire saine (d'après Gayrard et al., 2000)

Figure 5 : Représentation d'une coupe longitudinale d'un trayon de la glande mammaire bovine (d'après Frandson, 1986 ; Quinn 1980).

Figure 6 : Représentation d'une cellule épithéliale mammaire sécrétrice et des voies principales de sécrétion des composants du lait (Bauman et al., 2006 ; Mather et Keenan, 1998). Les voies de sécrétion des goutellettes lipidiques cytoplasmique (A), la voie de sécrétion des micro-goutellettes lipidiques et du contenu des vésicules de sécrétion (C) voie de sécrétion de composants de lait.

Figure 7 : Le pathosystème mammité, trois acteurs majeurs aux interactions encore mal connues (d'après Le Maréchal C, 2010)

Chapitre I-C

Figure 8 : Cycle infectieux présumé de *S. aureus* dans la glande mammaire (d'après Sinha et al., 2012)

Figure 9 : Protéines staphylococciques mises en jeu lors de la colonisation de surfaces biotiques (tissus) et abiotiques (cathéters) (d'après Heilmann C., 2011)

Figure 10 : Représentation schématique des facteurs protéiques staphylococciques impliqués dans l'invasion aux cellules épithéliales de l'hôte (d'après Fraunholz et Sinha, 2012)

Figure 11 : Observation en microscopie électronique à transmission de l'adhésion et de l'internalisation de *S. aureus* au sein de cellules épithéliales (d'après Ogawa et al., 1985 ; Bayles et al., 1998)

Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction initiale nécessaire à l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales (d'après Sinha and Fraunholz, 2010 ; Fraunholz and Sinha, 2012).

Figure 13 : Représentation de la vie intracellulaire de *S. aureus* (d'après Fraunholz et Sinha, 2012). 1) Adhésion focale initial. 2) Adhésion fibrillaire et endocytose. 3) Formation de pores au niveau de la membrane cellulaire via l'action de l' α -toxine. 4a) Lyse bactérienne via le phagolysosome. 4b) Survie et

croissance bactérienne dans l'endosome. 4c) Echappement du phagosome et croissance cytoplasmique via l'action de l' α -toxine et de phospholipases (5a/b). 6) Activation de NF κ B et synthèse de cytokine. 7) Induction d'une mort cellulaire par l'activation des caspases cellulaires. 8) Perméabilisation mitochondriale via l'action de PVL. 9) Activation de l'inflammasome cellulaire suite à la lyse mitochondriale. 10) Réplication bactérienne dans l'autophagosome conduisant à la mort de la cellule hôte. ADAM, metalloprotease and disintegrin; ARP2/3, actin-related protein 2 and 3; Atl, autolysin ; CytC, cytochrome c; Eap, extracellular adherence protein; FAK, focal adhesion kinase; FnBP, fibronectin-binding protein; HSP, heat shock protein; IL, interleukin; NF κ B, nuclear factor κ B; NWASP, neural Wiskott–Aldrich syndrome protein; PAX, paxillin; SR, scavenger receptor; VCL, vinculin; WTA, wall teichoic acid.

Figure 14 : Représentation schématique du processus de formation d'un biofilm 'd'après Vlamakis et al., 2013). 1) Adhésion initiale à une surface biotique ou abiotique. 2) Formation de microcolonies. 3) Mise en place d'une communication de type quorum-sensing. 4) Maturation du biofilm et acquisition de son architecture tridimensionnelle. 5) Equilibre entre population de bactéries à l'état sessile et planctonique favorisant la dispersion et la colonisation de nouvelles niches

Figure 15 : Représentation de la régulation temporelle de l'expression des facteurs de surfaces et des facteurs sécrétés chez *S. aureus* (d'après Lowy FD., 1998).

Chapitre I-D

Figure 16 : Représentation schématique des différents types de compétition pour une niche écologique entre BL et pathogènes.

Figure 17 : Représentation schématique de l'impact des BL sur les cellules épithéliales de l'hôte.

Figure 18 : Représentation schématique de l'interaction initiale requise pour l'internalisation de *S. aureus* (d'après Fraunholz et Sinha, 2012)

Chapitre IV

Figure 19 : Inhibition de l'internalisation de *S. aureus* RF122 et NB305 par *L. casei* BL23 ou son mutant BL23 Δ FnbA aux cellules MAC-T.

Figure 20: Observation en microscopie confocale de l'internalisation de *S. aureus* au sein de cellules MAC-T. En rouge, réseau d'actine cellulaire marqué à la phalloïdine-TRITC, en bleu, marquage des acides nucléiques au DAPI et en vert observations des *S. aureus* internalisés exprimant la GFP.

Figure 21 : Résultats préliminaires des dosages en test ELISA de la production d'IL-10 par les PBMCs en interaction avec les différentes souches de BL sélectionnées (résultats préliminaires).

Figure 22 : Résultats préliminaires de l'expression des gènes cellulaires par qRT-PCR au cours d'une interaction bi ou tripartite. Lignée de CEM MAC-T, RF122, souche *Staphylococcus aureus* RF122, LB667, souche *Lactobacillus casei* CIRM667.

Tables des illustrations : Tableaux

Chapitre I-B

Tableau 1 : Grille de paiement du lait de vache en Poitou-Charentes en 2013 (source : Centre régional interprofessionnel de l'économie laitière en Poitou-Charentes).

Tableau 2 : Liste des cellules du système immunitaire et de leurs principales fonctions.

Tableau 3 : Caractéristiques des différents types de mammites bovines.

Chapitre I-C

Tableau 4 : Comparaison de l'étiologie des mammites bovines en France et en Grande-Bretagne (d'après Bidaud et al., Intervet, 2007). SCN : staphylocoques à coagulase négative

Tableau 5 : Exemples de caractères spécifiques à l'hôte et de leurs déterminants génétiques (d'après Peton et Le Loir, 2013)

Tableau 6 : Infections animales les plus communes causées par les staphylocoques à coagulase positive (d'après Peton et Le Loir, 2013)

Tableau 7 : Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans les mammites staphylococciques (d'après Le Loir et Gautier, 2010)

Chapitre I-D

Tableau 8 : Caractérisation de l'écosystème mammaire : des approches phénotypiques aux approches génomiques.

Tableau 9 : Exemples d'études reflétant l'impact des BL sur la santé des animaux (d'après Bouchard et al., in prep).

Chapitre IV

Tableau 10 : Liste des gènes de *S. aureus* et des cellules eucaryotes bovines identifiés pour l'analyse de l'expression génétique par sRT-PCR (d'après Bougarn et al., 2011 ; Porcherie et al., 2012 ; Rainard et al., 2006 ; heilmann et al., 2011)

Abréviations

ADN	= Acide désoxyribonucléique
Agr	= Accessory gene regulator
ARN	= Acide ribonucléique
ARNm	= Acide ribonucléique messenger
BHI	= Brain heart infusion
BL	= Bactéries lactiques
CCS	= Comptage des cellules somatiques
CFU	= Colony forming unit
CPA	= Cellule présentatrice d'antigènes
CNIEL	= Centre national interprofessionnel de l'économie laitière
CNS	= Coagulase negative staphylococci
CS	= Cellules somatiques
DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGM	= Élément génétique mobile
ELISA	= Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO	= Food and Agriculture Organization
Fc	= Partie constante des immunoglobulines
Ig	= Immunoglobuline
IL	= Interleukine
LAB	= Lactic acid bacteria
LT4	= Lymphocyte T 4
LT8	= Lymphocyte T 8
MGEs	= Mobile genetic elements
MLST	= Multi locus sequence typing
MRSA	= Multi resistant <i>staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	= Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
Nano Lc MS/MS	= Nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry
PBMC	= Peripheral blood mononuclear cell
PBS	= Phosphate buffer saline
PMN	= Polynucléaires neutrophiles
PFGE	= Pulsed field gel electrophoresis
RAPD	= Random amplified polymorphic DNA
RT-PCR	= Real Time-Polymerase Chain Reaction
SCC	= Somatic cell count
SCP	= Staphylocoque à coagulase positive
SCN	= Staphylocoque à coagulase négative
SCV	= Small colony variant
SERAMs	= Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules
SERPA	= Serological proteome analysis
SDS-PAGE	= Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNP	= Single nucleotide polymorphism
TLR	= Toll-like receptor
UFC	= Unité formant colonie
ZO-1	= Zonula occludens 1

Avant-propos

Cette thèse a été financée par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Elle s'est déroulée de 2009 à 2013 et s'est inscrite dans le cadre d'un projet de recherche (stratégie Non-AntiBiotique Anti-Bactéries pathogènes / projet NABAB) visant à explorer des capacités inhibitrices des écosystèmes naturels contre les contaminations à *S. aureus* en contexte laitier. Ce projet est financé par l'Agence Nationale de la Recherche (Programme ALIA).

Ce travail a été réalisé dans l'équipe « Bacterial Biodiversity and In Situ Interaction » (B2ISI) de l'UMR STLO (Science et Technologie du Lait et de l'Œuf), INRA-Agrocampus Ouest (Rennes, France). Les thématiques de recherche du STLO portent sur les composants du lait et de l'œuf et l'amélioration de la qualité et de la sécurité de la filière laitière et des ovoproduits. L'équipe B2ISI s'intéresse en particulier à la biodiversité et aux interactions de deux espèces bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Propionibacterium freudenreichii*) avec leur environnement dans le contexte laitier.

Ce projet de thèse a aussi bénéficié ou été à l'origine de collaborations nationales et internationales avec :

- le laboratoire Interaction des Commensales et Probiotiques avec l'Hôte (MICALIS, Jouy-en-Josas, France) pour l'évaluation du potentiel immunomodulateur de souches de bactéries lactiques
- Le laboratoire de Recherche Génomique des Hôpitaux Universitaires de Genève (Suisse), pour le séquençage de la souche *S. aureus* Newbould 305
- Le CERELA, laboratoire de références des Bactéries Lactiques (Tucumán, Argentine), pour une partie de la caractérisation du potentiel probiotique des souches de bactéries lactiques (mobilité d'un mois que j'ai effectuée dans le cadre d'un programme d'échange ECOS-SUD)
- L'université fédérale du Minas Gerais (Belo Horizonte, Brésil), pour l'analyse bioinformatique du génome de Newbould 305.

CHAPITRE I-A

Introduction générale

Les mammites dans la filière laitière :

« Un enjeu socio-économique important »

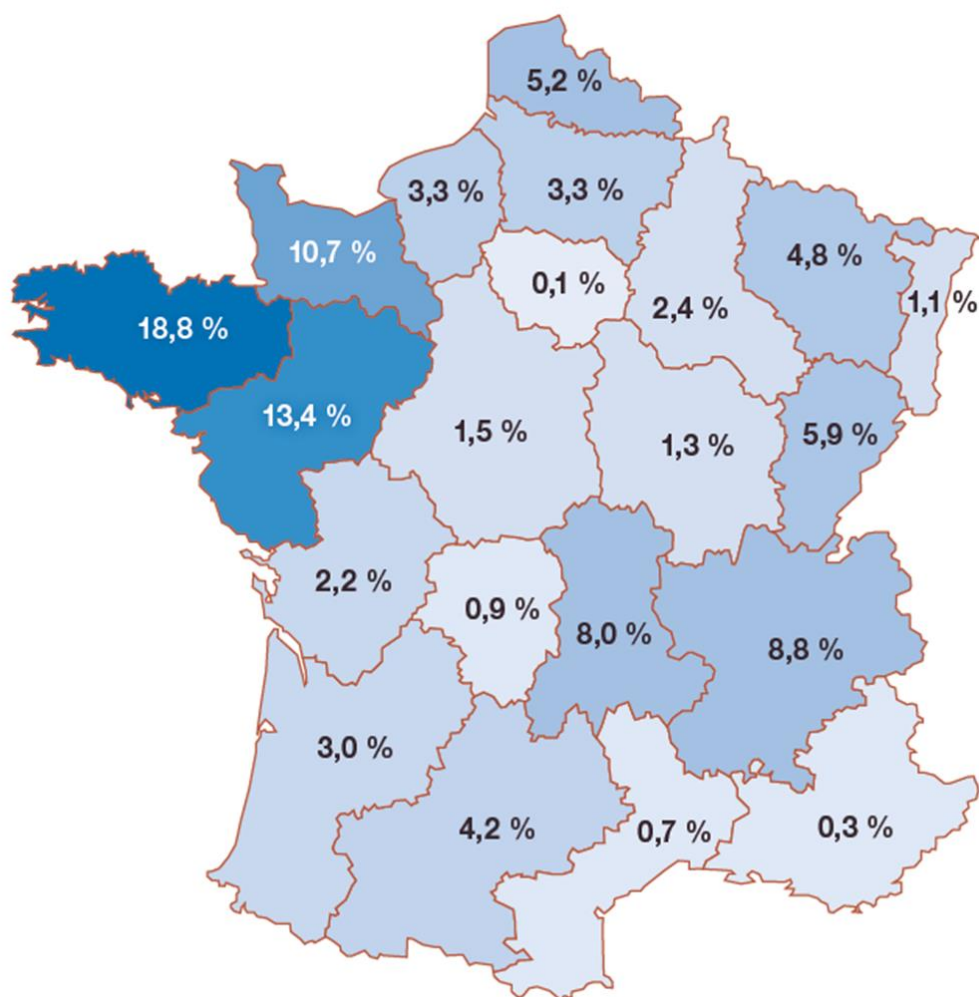


Figure 1: Répartition des producteurs de lait de vache par région en 2011 (CNIEL 2013)

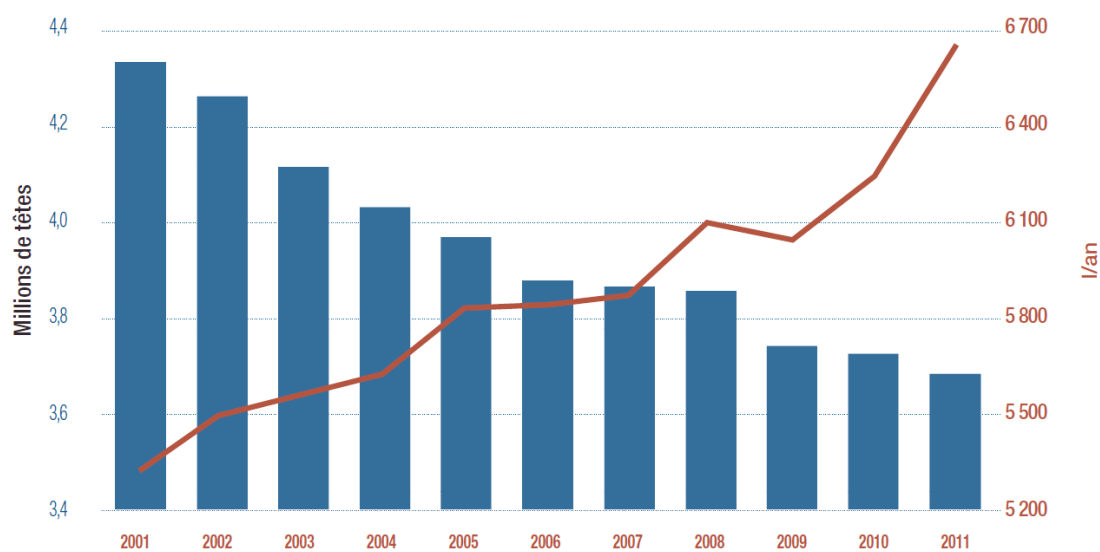


Figure 2: Nombre de vaches laitières et leur rendement en France (Agreste/CNIEL 2013)

En 2011, la production laitière mondiale a atteint les 727 millions de tonnes toutes espèces confondues (FAO/CNIEL, 2013). Par ordre d'importance, les laits de vache, de bufflonne, de chèvre et de brebis constituent les productions majoritaires. En France, en 2012, plus de 23 milliards de litres de lait de vache, 470 millions de litres de lait de chèvre et 250 millions de litres de lait de brebis ont été collectés (CNIEL, 2013). Dans l'industrie laitière, cette matière première sert à la production de fromages (36.8 % de la collecte), de matières grasses laitières (18.7 %), de poudres de lait (13.8 %), de laits conditionnés (10.6 %), de yaourts et desserts lactés (7 %), de crèmes conditionnées (7.5 %) pour la majeure partie des transformations. Le reste sert à la réalisation de poudre de lactosérum, la préparation de caséines et de lait concentré (CNIEL, 2013).

En France, c'est un secteur économique majeur principalement pour le Grand-Ouest qui rassemble 42.9 % de la production nationale (figure 1). Depuis des années, les progrès techniques en élevage (alimentation, production, traite...) mais aussi la sélection génétique et l'amélioration des conduites d'élevage ont permis d'augmenter la productivité (figure 2). Cette sélection génétique basée essentiellement sur des critères de quantité ou de qualité de lait (teneur en matière grasse ou protéique) est corrélée négativement avec la reproduction (problème de fertilité) et la santé de l'animal (mammites, métrites...) (Thompson et al., 1984 ; Simianer et al., 1991 ; Funk et al., 1993 ; Akers et al., 2000 ; Detilleux et al., 2002 ; Rupp et Boichard, 2003 ; Pighetti et Elliott, 2011). Cette sensibilité des animaux aux différentes maladies engendre de lourdes pertes économiques pour les élevages. Les problèmes de reproduction, les mammites et les boiteries représentent les maladies les plus importantes en élevage bovin. Ces maladies engendrent des pertes économiques élevées, du travail supplémentaire et une atteinte au bien-être animal (Delacroix et al., 2000 ; Fourichon et al., 2001 ; Rushen et al., 2001). Les mammites représentent la première cause de consommation d'antibiotiques dans les élevages (Barkema et al., 2006). Halasa et al. ont estimé, en 2009, le coût annuel moyen des mammites à 4896 euros pour un troupeau de 100 vaches laitières (Halasa et al., 2009). Par extrapolation, ceci représente près de 200 millions d'euros de pertes annuelles pour l'ensemble du cheptel français. Ce coût englobe les frais vétérinaires, les traitements, le surcroît de travail et un manque à gagner global (baisse de productivité des animaux et réforme anticipée...). Ces critères économiques associés à une demande sociétale croissante pour l'amélioration du bien-être animal et la diminution du recours aux antibiotiques (entre autres intrants) dans les productions agricoles justifient les efforts de recherche dédiés à la compréhension, la prévention et le traitement des mammites.

La mammite : première cause de pertes économiques en élevage

Les mammites constituent la première cause de pertes économiques pour les élevages de ruminants laitiers avec une facture qui s'élève à plusieurs millions d'euros par an (Rainard et Gilert, 2010). Le coût s'explique par une baisse de la production de lait (Seegers et al., 2003), des problèmes de transformabilité de la matière première (Le Maréchal et al., 2011), la réforme prématurée des animaux atteints de mammites cliniques ou chroniques (Seegers et al., 2003), les coûts de traitements (produits et frais vétérinaires) (Barkema et al., 2006) et les pénalités financières sur la qualité du lait en fonction du comptage des cellules somatiques (CS), sans compter la surcharge de travail pour l'exploitant. De nombreux problèmes sanitaires peuvent aussi en découler de la moindre qualité de la matière première. En effet, la présence de germes dans le lait suite à la traite d'animaux infectés peut entraîner une contamination tout au long de la filière laitière causant notamment des toxi-infections alimentaires (De Buyser et al., 2005).

Chez les bovins, trois germes sont principalement responsables des mammites bactériennes : *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. La maîtrise des mammites en élevage reste un enjeu sanitaire majeur. Malgré le nombre important d'études dédiées à cette maladie, aucune stratégie de lutte efficace n'a été mise au point. L'antibiothérapie reste la solution principalement utilisée, mais son efficacité est toutefois limitée. Cependant, depuis 2009 et suites aux nouvelles directives mises en place par le « plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire » (Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire), la réduction de l'utilisation d'antibiotiques en élevage et en agriculture est devenue une priorité. Ce plan national vise à une réduction de l'usage des antibiotiques de 25 % en 5 ans et une prolongation de ce plan a été mise en place en France, avec le plan d'action Ecoantibio 2012-2017. Pour répondre à ce plan, la recherche scientifique développe de nouvelles stratégies de lutte, préventive ou curative, dans le but de réduire la consommation d'antibiotiques, consommation associée à des problèmes de sécurité sanitaire et surtout à l'émergence de germes résistants.

L'une des alternatives émergentes est la lutte biologique et en particulier l'utilisation de bactéries issues de l'écosystème mammaire pour empêcher l'implantation ou le développement du pathogène. L'amélioration des connaissances sur les interactions entre le pathogène, les tissus de la glande mammaire et le microbiote endogène permettra d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques. Ce projet de thèse vise i) à mieux connaître la composition de la flore endogène de l'écosystème mammaire bovin, ii) et à caractériser la capacité de certaines composantes (bactérie lactique) à limiter la colonisation des cellules de

la glande mammaire par *S. aureus*, un pathogène majeur responsable de mammite. L'introduction bibliographique qui suit présente le contexte du sujet et les connaissances actuelles sur les mammites à *S. aureus* et les traitements alternatifs. Au terme de cette introduction, la problématique ainsi que la stratégie seront présentées.

CHAPITRE I-B

Introduction bibliographique

Les mammites bovines :

« De l'anatomie à la physiologie de l'infection »

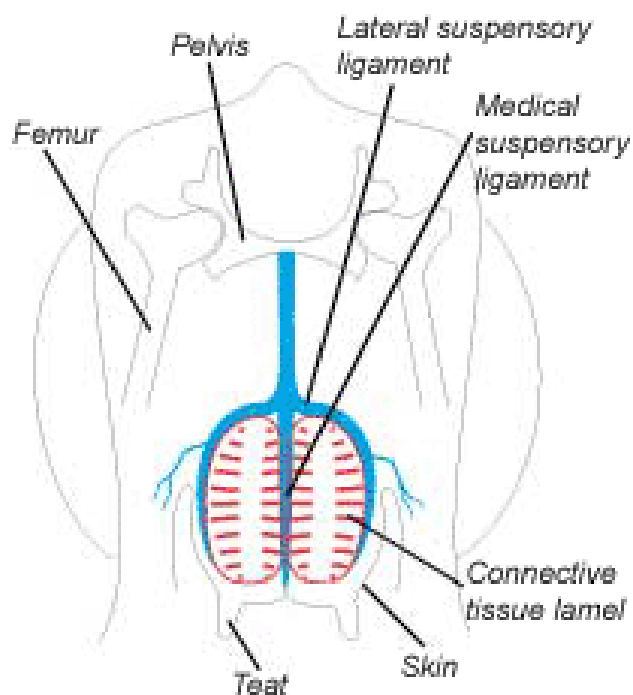


Figure 3: Structure générale de la mamelle (d'après Sandholm et al., 1990)

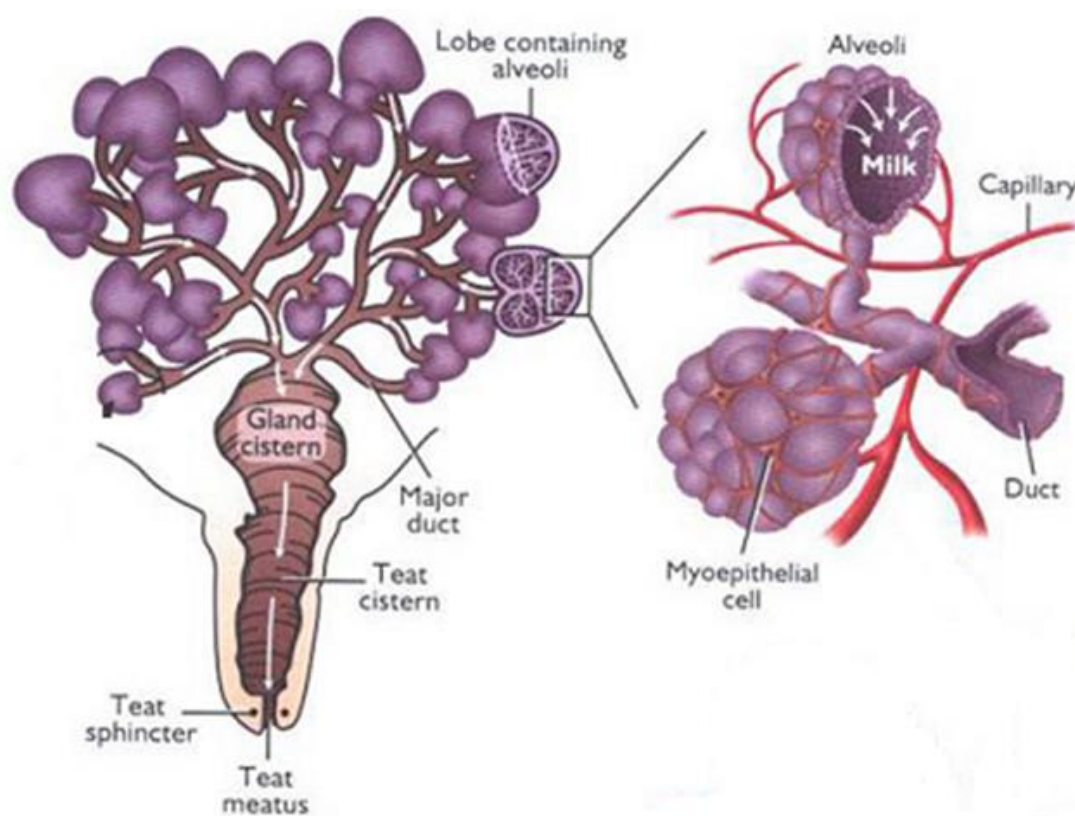


Figure 4: Schéma de la glande mammaire saine (d'après Gayrard et al., 2000)

I. Généralités

La mammite est une inflammation de la glande mammaire qui est principalement causée par une infection d'origine bactérienne. Elle peut aussi être due à une infection d'origine virale, ou fongique ou encore résulter de changements physiologiques, d'un traumatisme ou d'une lésion (Oviedo-boyso et al., 2007). Cette inflammation intramammaire est caractérisée par de nombreuses modifications observables directement dans le lait. L'une de ces modifications est l'augmentation du nombre de cellules somatiques (CS) dans le lait. Ce taux de CS est retenu d'ailleurs aujourd'hui comme critère de la qualité sanitaire du lait.. Ainsi, au niveau de l'exploitation agricole, un taux de CS inférieur à 250.000 cellules/mL correspond à une qualité sanitaire acceptable. A l'inverse, un taux supérieur à 250.000 cellules/mL entrainera une diminution du prix du litre de lait (Tableau 1).

Tableau 1 : Grille de paiement du lait de vache en Poitou-Charentes en 2013 (source : Centre régional interprofessionnel de l'économie laitière en Poitou-Charentes).

Seuil en cellules par mL	incidence sur le prix en euros pour 1.000 L
< 250.000	prix de référence
251.000 à 300.000	-3.049 €
301.000 à 400.000	-9.147 €
> 400.000	-18.294 €

II. La glande mammaire saine

La mamelle est une glande exocrine composée de quatre quartiers indépendants chez les bovins, située sur la face ventrale de l'animal. Les quartiers de droite et de gauche sont séparés par un ligament de suspension central composé de tissu élastique (figure 3). La morphologie de la mamelle est importante à prendre en compte puisque si le ligament médian est trop faible, cela aura pour conséquence une mamelle qui pend trop. Ceci entrainera des difficultés à la fois pour la traite et une exposition plus importante à des agents pathogènes due à la proximité des trayons avec le sol.

Le parenchyme mammaire possède deux lobes, eux-mêmes divisés en lobules formés d'acini ou d'alvéoles glandulaires. Chaque alvéole est constituée principalement d'une couche monocellulaire (lactocytes) qui est le lieu de synthèse du lait. Les lactocytes entourent la lumière alvéolaire et reposent sur un réseau de cellules myoépithéliales. Chaque alvéole

irrigue la citerne de la glande via des canaux galactophores (figure 4). La masse glandulaire épithéliale est une structure transitoire, elle ne se forme qu'au cours de la gestation, elle produit le lait pendant la période de lactation et elle disparaît après le sevrage ou le tarissement.

a. Les canaux galactophores

Les petits canaux galactophores qui drainent chaque alvéole se rejoignent pour former des canaux tertiaires. Ces derniers se rassemblent en canaux secondaires puis primaires qui aboutissent à la citerne de la glande. Des cellules myoépithéliales entourent l'épithélium des canaux et des alvéoles et se contractent sous l'action de l'ocytocine, provoquant l'éjection du lait.

b. La citerne de la glande mammaire

Il existe une citerne de la glande par quartier. La citerne correspond à une dilatation des canaux galactophores en sinus et en poches. Chez la vache, le volume de la citerne est de 400 à 500 mL, mais le volume est variable en fonction de la race.

c. Les trayons

A la base de la citerne de la glande mammaire se trouve le trayon (ou pis) par lequel est éjecté le lait. Le trayon représente le premier contact ouvert entre le milieu extérieur et l'intérieur de la glande. Il constitue ainsi la première protection de la glande face aux agents pathogènes. Le trayon est séparé de la citerne par des plis annulaires de tissus, constituant une barrière contre une invasion par des agents pathogènes (figure 5).

d. La cellule épithéliale mammaire

La cellule épithéliale mammaire est une cellule sécrétrice constituant la plus petite unité des alvéoles ou acini. En lactation, les cellules épithéliales mammaires sont polarisées avec la face basale située du côté de la lumière alvéolaire. Ces cellules synthétisent les composants du lait par exocytose pour les globules gras et par pinocytose inverse pour les protéines et les sucres (Figure 6), mécanisme par lequel la cellule libère les molécules par fusions de vésicules cellulaires avec la membrane plasmique libérant leur contenu dans le milieu extracellulaire. Ces composants rejoignent les canaux galactophores puis la citerne (Mather & Keenan, 1998 ; Bauman et al., 2006).

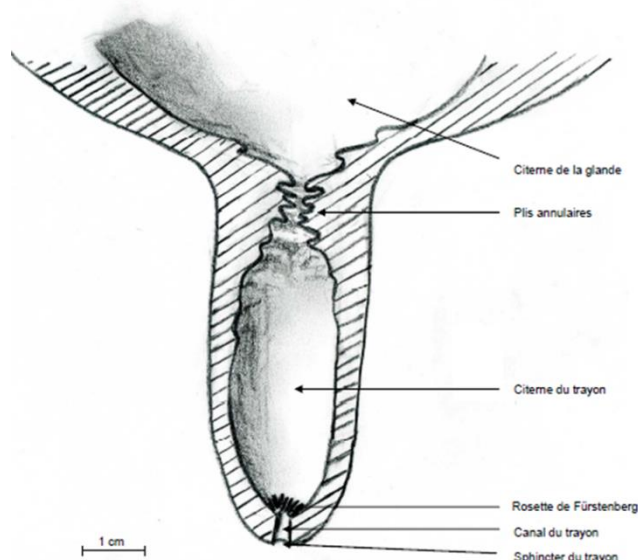


Figure 5 : Représentation d'une coupe longitudinale d'un trayon de la glande mammaire bovine (d'après Frandson, 1986 ; Quinn 1980).

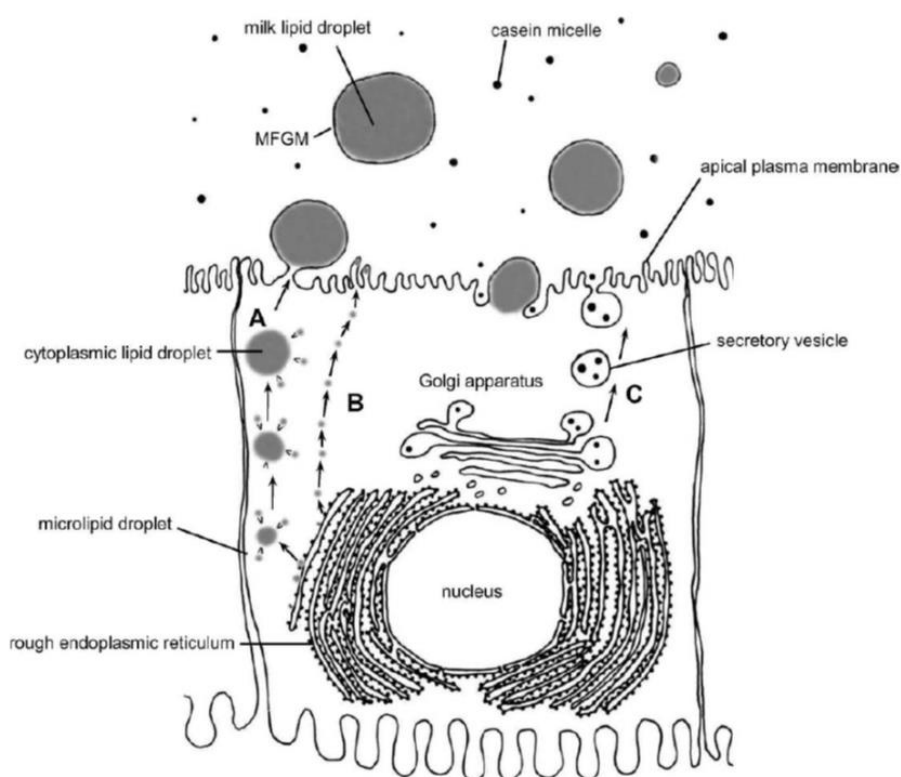


Figure 6 : Représentation d'une cellule épithéliale mammaire sécrétrice et des voies principales de sécrétion des composants du lait (Bauman et al., 2006 ; Mather et Keenan, 1998). Les voies de sécrétion des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (A), la voie de sécrétion des micro-gouttelettes lipidiques et du contenu des vésicules de sécrétion (C) voie de sécrétion de composants de lait.

III. Les protections naturelles de la glande mammaire

a. Les défenses anatomiques

La glande mammaire est protégée par une variété de mécanismes de défense (Nickerson, 1987). Parmi eux, il existe une protection physique assurée par un sphincter musculaire qui assure l'étanchéité de l'entrée du canal du trayon. L'anatomie même du canal contribue à la protection : l'épithélium kératinisé permet de limiter l'attachement des bactéries pathogènes réduisant leur implantation et leur progression (Paulrud, 2005 ; Krömker et Friedrich, 2009). De plus, à la base de la glande entre la citerne du trayon et la citerne de la glande, la Rosette de Furstenberg est un repliement muqueux enrichi en leucocytes qui participe grandement à la protection vis-à-vis du pathogène présent (Figure 5). Le trayon est le seul orifice entre le système interne de sécrétion et l'environnement et constitue donc la seule voie d'accès naturel possible pour les agents pathogènes (outre une lésion cutanée au niveau de la glande). Plusieurs défenses ou barrières existent pour limiter la pénétration des agents pathogènes. En dehors des barrières physiques, de nombreuses substances bactériostatiques (acides myristique, palmitoléique et linoléique...) et de nombreux facteurs solubles (lactoferrine, lysozyme, lactoperoxydase...) assurent la première ligne de défense anti-bactérienne.

b. Les défenses immunitaires

Outre les barrières physiques, l'immunité de l'hôte assure la seconde ligne de défense. Elle peut être divisée en deux types : immunité innée et acquise. Les défenses immunitaires sont assurées par des cellules produites par la moelle osseuse, les leucocytes (Tableau 2). Même en absence d'infection, celles-ci sont présentes dans la glande à des concentrations entre 50.000 à 200.000 cellules par millilitre de lait (Sordillo et al., 1997;Bradley et al., 2002).

L'immunité innée, ou non spécifique, est particulièrement importante lors d'une première exposition à un agent pathogène. Les réponses non spécifiques sont déjà présentes et rapidement activées au site d'infection. La réponse immunitaire innée est principalement médiée par les macrophages, neutrophiles, les « Natural Killer » ainsi que d'autres facteurs solubles. Si malgré cette immunité innée le pathogène n'est pas éliminé, l'immunité acquise (ou spécifique) sera induite. Ce type de réponse immunitaire reconnaît spécifiquement des déterminants antigéniques d'un pathogène afin de l'éliminer sélectivement. La réponse

immunitaire acquise est principalement médiée par les anticorps (immunité humorale), les macrophages (cellules présentatrices d'antigènes ; CPA) et les cellules lymphocytaires (Rainard et Riollot, 2006) (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des cellules du système immunitaire et de leurs principales fonctions.



Type de cellules		Rôle principaux
Cellule dendritique		Phagocytose / opsonisation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation) Cellules présentatrices d'antigènes
Monocytes - Macrophage		Phagocytose / opsonisation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation) Cellules Présentatrices d'Antigènes
Granulocytes (=Polynucléaire)	Neutrophiles	Phagocytose Destruction des agents pathogènes Homéostasie de l'inflammation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation)
	Basophiles	Synthèse d'histamine et d'héparine Activation de l'inflammation Action antiallergique Perméabilité tissulaire
	Eosinophile	Action antiparasitaire Activation de l'inflammation Action antiallergique Perméabilité tissulaire
Mastocytes		Sécrétion de sérotonine, histamine et héparine Action antiallergique Synthèse de cytokines
Lymphocytes	B	Immunité humorale Production d'immunoglobuline (anticorps) Plasmocytes (synthèse d'anticorps spécifique à l'opsonisation), cellules B à mémoire (mémoire des antigènes)
	T	Immunité cellulaire Action cytotoxique (destruction des cellules infectées), auxiliaire (activation de cellules immunitaires), ou suppresseur (retour à l'état basal de l'inflammation)
	Cellule NK	Cellules tueuses naturelles Lyse des cellules du non-soi sans reconnaissance spécifique d'antigène Libération de perforine et granzyme

La défense de la glande mammaire nécessite une action coordonnée et interactive des deux types de réponses immunitaires. Les macrophages sont les cellules dominantes dans le lait sain (Rémy et al., Guides France Agricole, 2010 ; Le Loir et Gautier., 2010). Leur rôle est de détecter les flores indésirables et de recruter les neutrophiles du sang vers la glande mammaire via la libération de cytokines (Paape et al., 2002,2003) (tableau 2). Lors d'une infection, la proportion de macrophages diminue mais assure le rôle de présentation d'antigènes. Les neutrophiles sont donc activement transférés du sang vers la citerne dès le

début de l'inflammation et ils représentent jusqu'à 90 % des cellules somatiques lors d'une mammite (Paape et Wergin, 1977 ; Paape et al., 2000). Si les pathogènes persistent, les lymphocytes B et T seront également recrutés. Les lymphocytes B assurent la synthèse d'anticorps (immunité humorale). Les lymphocytes T assurent une immunité cellulaire. Les lymphocytes T4 (LT4, ou « helper ») sont activés via les CPA et orientent la réponse vers une immunité humorale ou cellulaire. Les LT8, cellules cytotoxiques, assurent l'immunité cellulaire proprement dite (Oviedo-Boyso et al., 2007; Rainard et Riollot, 2006 ; Sordillo et Streicher, 2002). Les principaux effecteurs solubles du système immunitaire sont les anticorps produits par les lymphocytes B dont quatre classes participent à l'immunité mammaire, les IgG1/2, les IgA et les IgM (Oviedo-Boyso et al., 2007 ; Rainard et Riollot, 2006).

c. L'immunité des cellules épithéliales

La détection du pathogène ainsi que la réponse inflammatoire initiale sont cruciales pour le recrutement des neutrophiles (Rainard et Riollot, 2006). Certaines cellules du système immunitaire peuvent résider dans la glande mammaire et participer au recrutement des neutrophiles, cependant, d'autres lignées cellulaires participent à ce phénomène comme les CEM. En effet, le tissu mammaire bovin a montré une capacité à exprimer des ARNm des récepteurs membranaires TLR2, 4 et 9, impliqués dans l'interaction avec les bactéries, ainsi que leur surexpression durant une infection intramammaire (Rainard et Riollot, 2006 ; Goldammer et al., 2004 ; Strandberg et al., 2004). Les TLR sont des récepteurs cellulaires permettant la reconnaissance des « pathogen-associated microbia pattern ». La stimulation des TLR par les PAMPs est à l'origine d'une cascade d'activation moléculaire intracellulaire incluant des molécules comme MyD88 et le groupe des "IL1-R-associated serine kinase" (IRAK) (Medzhitov R, 1997). Cette cascade conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui est une plaque tournante intra-cellulaire responsable de la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-12) et directement effectrices comme le TNF α aboutissant à la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules épithéliales mammaires peuvent ainsi réagir en synthétisant des cytokines proinflammatoires telles que l'IL6, l'IL8 et le TNF- α permettant le recrutement des cellules spécialisées (Rainard et al., 2003 ; 2005, Paape et al., 1977 ; 1981 ; 2000). Ces résultats ont été obtenus à partir de cellules primaires ou de lignées immortalisées (MAC-T) qui ont toutes deux montré des capacités de sécrétion. Par conséquent, les cellules du tissu mammaire participent grandement et sont de plus en plus étudiées pour leur capacité à détecter les pathogènes et à induire le recrutement de cellules

immunitaires spécialisées (Hyunh et al., 1991 ; Boudjellab et al., 2000 ; Bannerman et al., 2004 ; Riollet et al., 2000 ; 2001). Cependant, certaines études ont montré des différences *in vitro* entre des lignées primaires ou immortalisées, soulignant les limites de l'utilisation des lignées de cellules comme les MAC-T dans l'étude de la réponse immunitaire (Wellnitz et al., 2004).

IV. Le processus infectieux

Le processus infectieux au cours d'une mammite d'origine bactérienne n'est pas totalement élucidé. Cependant, l'ensemble des données *in vitro* (lignées cellulaires, explant, culture primaire) ou *in vivo* (infections intramammaires) permettent de dessiner un schéma d'infection cohérent. Les mammites d'origine bactérienne se caractérisent par trois étapes successives : la contamination de la mamelle, l'invasion cellulaire et l'inflammation (Oviodeo-Boyso et al., 2007). La première étape est la contamination du trayon par le pathogène. Une fois le canal du trayon contaminé, les bactéries peuvent atteindre la lumière de la citerne, se multiplier puis envahir le tissu mammaire (Le Loir et Gautier, 2010). La réaction inflammatoire et immunitaire qui est induite par l'invasion de la glande mammaire permet le recrutement en très grand nombre de polynucléaires neutrophiles et d'autres leucocytes (monocytes et lymphocytes) (Rainard et Riollet, 2006). Le cycle infectieux sera décrit en détail dans le paragraphe relatif aux mammites staphylococciques, car celui-ci peut se dérouler différemment en fonction du pathogène impliqué.

V. Le développement des mammites et leur typologie

De la mammite subclinique à une chronicité de l'infection

La mammite subclinique est caractérisée par l'absence de symptômes visibles. Les mammites subcliniques notamment celles à *Staphylococcus aureus* peuvent évoluer vers une mammite chronique, à savoir, une infection persistante ou latente qui peut resurgir à l'état clinique en fonction du temps et de l'environnement. Chez les bovins, 80 % des infections persistent pendant la lactation en cours, voire pendant le tarissement (Rainard et Poutrel, 1982).

Lors du développement de l'infection, beaucoup de facteurs peuvent influencer l'orientation de la mammite. En effet, les facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux influencent grandement la résistance ou la sensibilité aux infections intramammaires et orientent donc leur sévérité (Sordillo et al., 2005). Une fois l'infection en

place et l'inflammation déclenchée, le taux de cellules somatiques présentes dans le lait permet de révéler la présence d'une mammite. Chez les bovins, un taux de cellules excédant 250.000 cellules/mL est considéré comme révélateur de mammite. Les symptômes associés à l'inflammation permettent de classer les mammites selon les modifications observables au niveau de la mamelle (chaleur, douleur, rougeur, gonflement) ainsi que la composition du lait (grumeaux, couleur, taux de CS) (Oviedo-Boyso et al., 2007). Ces modifications définissent, le degré de sévérité : mammites subclinique, chronique, clinique subaiguë, clinique aiguë, clinique suraiguë et gangréneuse (tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques des différents types de mammites bovines.

Type de mammite	CCS	Bactéries	Symptômes locaux	Symptômes généraux
gangréneuse	↑↑	"+"	La glande mammaire devient rouge puis bleue et enfin noire ce qui est dû à un œdème sous-cutané, est chaude puis froide, thrombose de la veine abdominale, agalaxie	Développement rapide, diarrhée, difficultés pour se déplacer, difficultés respiratoires, déshydratation, forte fièvre, anorexie
clinique suraiguë	↑↑	"+"	La glande mammaire est gonflée, rouge, chaude et douloureuse, le lait sort difficilement	Forte fièvre, pouls rapide, dépression, faiblesse, perte d'appétit, perte de poids rapide
clinique aiguë	↑	"+"	Gonflement de la mamelle, chute de la production laitière	Fièvre, dépression, faiblesse, perte d'appétit
clinique subaiguë	↑	"+"	La glande mammaire est légèrement chaude ou sensible, il peut y avoir un gonflement du quartier infecté et des grumeaux dans les premiers jets	Bon état général
chronique	↑	"+"	Quartier déséquilibré, présence de grumeaux, abcès, tissus cicatriciels	Bon état général
subclinique	↑	"+"	Bon état général	Bon état général

VI. Etiologie des mammites bovines

L'incidence et la prévalence des pathogènes impliqués dans les mammites sont différentes chez les bovins et chez les ovins-caprins. Il existe une multitude de microorganismes responsables de mammites, notamment chez les bovins. Les microorganismes causant des mammites peuvent être classés en trois grandes catégories : les pathogènes majeurs (contagieux et environnementaux), les pathogènes mineurs et les pathogènes occasionnels.

Tableau 4 : Comparaison de l'étiologie des mammites bovines en France et en Grande-Bretagne (d'après Bidaud et al., Intervet, 2007). SCN : staphylocoques à coagulase négative

	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Escherichia coli</i>	SCN	<i>Staphylococcus aureus</i>
Intervet 2005 - 2007	25.40%	17.60%	14.50%	13.30%
Bradley 2007	29.20%	18.00%	17.80%	13.90%

a. Les pathogènes majeurs

Au sein de la famille des pathogènes majeurs impliqués dans les mammites bovines, on distingue les mammites contagieuses (réservoir mammaire) des mammites environnementales (réservoir environnemental : litière, sol...).

Les pathogènes contagieux sont essentiellement des bactéries capables de survivre et proliférer au niveau de la peau, des trayons et des pis. Ces pathogènes peuvent se transmettre à d'autres quartiers et d'autres animaux, les principaux représentants de cette catégorie sont *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus uberis* (Oviedo-Boyso et al., 2007, Bidaud et al., 2007, Bradley et al., 2007) (tableau 4).

Les pathogènes environnementaux sont présents dans l'environnement de l'animal (*S. uberis* est à la fois un pathogène avec un réservoir environnemental et mammaire) (Oviedo-Boyso et al., 2007). Ces pathogènes sont considérés comme opportunistes. Ils pénètrent la glande via le canal du trayon et induisent une inflammation mais sont souvent vite éliminés. De nombreux microorganismes peuvent être considérés comme pathogènes environnementaux mais les principaux représentants sont *Streptococcus uberis* et *Escherichia coli* (Bradley et al., 2002).

b. Les pathogènes mineurs

Ceux-ci se distinguent des pathogènes majeurs par la prévalence et par l'incidence des mammites qu'ils induisent. Ils causent généralement peu de problèmes et sont majoritairement des bactéries commensales de la peau et des poils. Cette catégorie regroupe l'ensemble des Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN), et plus fréquemment *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus heparis* (Pyorala et Taponen, 2009 ; Almeida et Oliver, 2001). On peut également retrouver *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium bovis*, etc... (Khan et Khan, 2006). Ces pathogènes ne causent généralement pas de mammites cliniques.

c. Les pathogènes occasionnels

La majorité des cas de mammites résultent d'une infection bactérienne impliquant les espèces citées ci-dessus. Cependant de nombreux autres microorganismes peuvent pénétrer la glande mammaire et déclencher une inflammation et donc une mammite. Parmi ces

pathogènes occasionnels se retrouvent des bactéries mais aussi des virus et certaines levures. Les pathogènes occasionnels les mieux identifiés sont les mycoplasmes, qui peuvent engendrer des mammites cliniques ou subcliniques (González et Wilson, 2003 ; Fox L.K., 2009 ; 2012).

VII. Bilan

La glande mammaire d'une vache laitière hautement productrice (Prim' Holstein par exemple) produit de manière quotidienne l'équivalent de 10 % du poids de l'animal en lait. Le choix de l'alimentation, la sélection génétique et les nouvelles pratiques de conduites d'élevages impactent, bien sûr, la production et la qualité du lait, mais on observe à l'inverse un effet négatif quant à la susceptibilité de ces animaux aux infections bactériennes, notamment intramammaires. Par conséquent, les mammites, qui représentent la maladie bovine la plus fréquente et la plus coûteuse, constituent un enjeu majeur pour la filière laitière. *S. aureus* est un pathogène majeur causant d'énormes problèmes en élevage en raison de son caractère contagieux (transmission aux machines à traire et aux animaux, persistance intramammaire, résistance aux antibiotiques...). Depuis de nombreuses années, la recherche scientifique s'intéresse aux interactions entre *S. aureus* et la glande mammaire afin de déterminer les étapes du processus infectieux, de connaître les déterminants du pathogène et de l'hôte associés à différentes sévérités afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans la suite de ce manuscrit, nous aborderons l'étude du pathosystème mammite (figure 7). Dans un premier temps, nous définirons les caractéristiques du pathogène et les déterminants de virulence. Dans un second temps, nous ferons un bilan des connaissances sur les facteurs de l'hôte et l'immunité contre *S. aureus*. Enfin, nous ferons un état de l'art sur le troisième acteur de ce pathosystème, à savoir le microbiote. L'étude des communautés microbiennes de la glande mammaire prend de l'importance du fait des nouvelles perspectives d'application dans la prévention et le traitement des mammites offertes par l'utilisation de certains de ces composants comme probiotique mammaire.

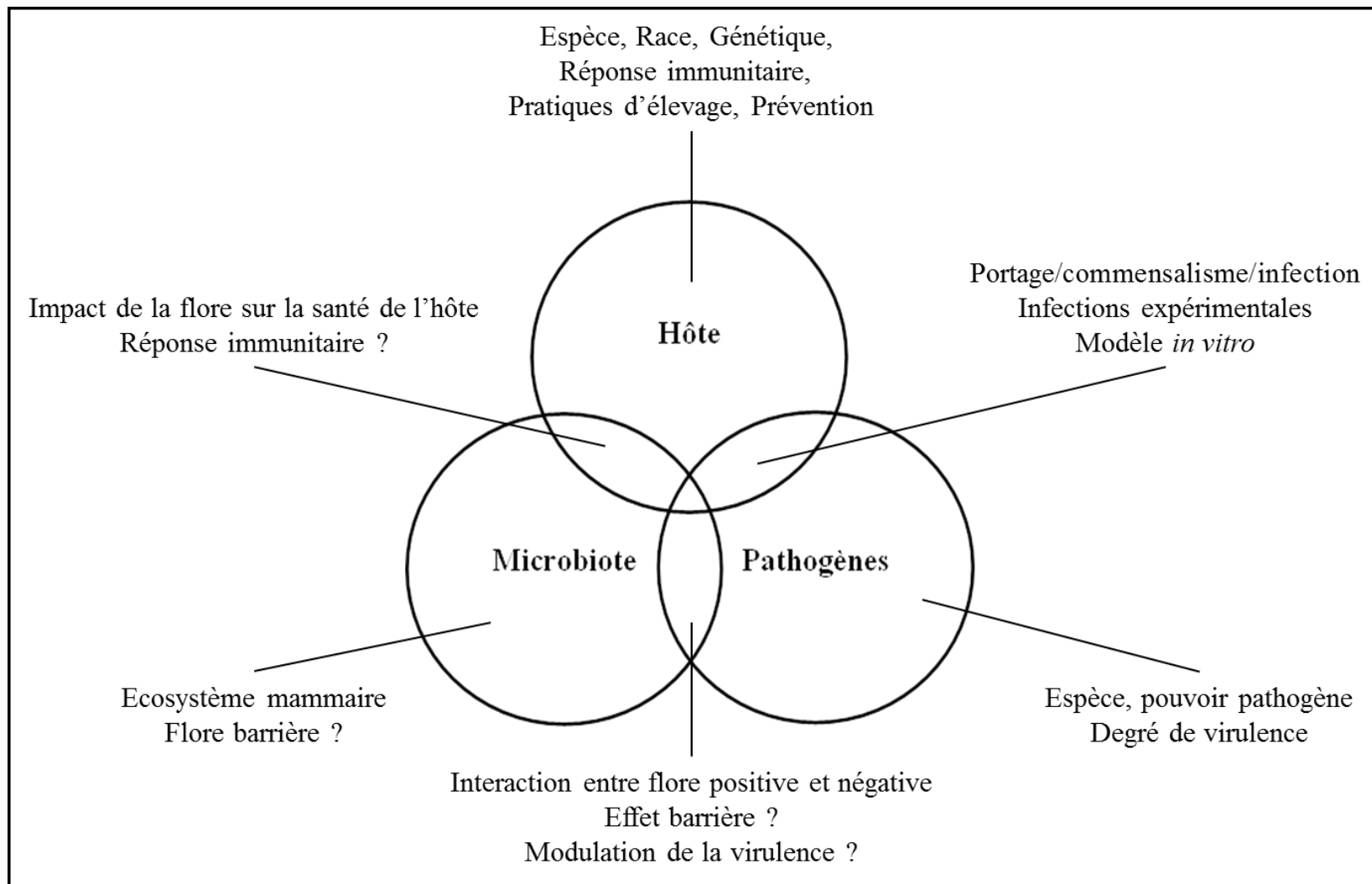


Figure 7 : Le pathosystème mammitaire, trois acteurs majeurs aux interactions encore mal connues (d'après Le Maréchal C, 2010)

CHAPITRE I-C

Introduction bibliographique

Les mammites à *Staphylococcus aureus* :

*« de la physiologie bactérienne
à l'infection intrammaire »*

I. *Staphylococcus aureus*

Parmi les nombreuses espèces et sous-espèces de staphylocoques, seules dix-huit espèces ont été retrouvées chez l'homme dont certaines sont associées à des infections. La majorité des espèces n'est retrouvée que chez l'animal. Les espèces de staphylocoques sont généralement classées en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre. Les staphylocoques à coagulase positive incluent les espèces généralement considérées comme pathogènes et les SCN regroupent des espèces réputés moins dangereuses voire des espèces utilisées en fermentation alimentaire, telles que *Staphylococcus xylosus* ou *Staphylococcus carnosus*.

S. aureus communément appelé le staphylocoque doré, est commensal de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux à sang chaud. Par sa présence quasi-permanente au contact de l'hôte, *S. aureus* est donc aux premières loges pour provoquer des infections opportunistes allant de superficielles (par exemple, impetigo, furoncle) (Tan et al., 1998 ; Frazee et al., 2005 ; Yamasaki et al., 2005) à profondes (ostéomyélite, endocardite) (Davis, 2005 ; Murray, 2005) ou généralisées (septicémie) (Lowy, 1998). Ce large panel d'infections est la résultante d'un équipement riche, sophistiqué et très variable en termes de facteurs de virulence.

a. Généralités

Du point de vue taxonomique, le genre *Staphylococcus* sp. appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Les membres du genre *Staphylococcus* sp. possèdent un contenu en G+C compris entre 30 et 39 %, une paroi insensible à l'action du lysozyme contenant des acides teichoïques et un peptidoglycane caractérisé par la présence de ponts penta-glycines. Les staphylocoques sont des coques à Gram+, immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas plans de plusieurs éléments (en grec staphylo signifie grappe de raisin). Les cellules ont un diamètre moyen de 0,8 à 1 µm. La grande majorité des souches de *S. aureus* possède une capsule mais certaines souches peuvent perdre ce caractère après culture. *S. aureus* présente une bonne croissance sur les milieux de laboratoires usuels en 18 à 24 h à 37 °C, sous agitation. Les colonies de *S. aureus* sont lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune-orange). Leur capacité de croissance en présence et absence d'oxygène atteste de leur métabolisme aéro-anaérobie facultatif. *S. aureus*

est halotolérant (croissance sur des milieux à 7% NaCl voire au-delà) et ce caractère est utilisé pour son isolement et l'élaboration de milieux sélectifs (milieu Chapman).

b. Variabilité génomique

Parmi les souches de *S. aureus* isolées de cas cliniques humains, vétérinaires ou alimentaires, on distingue une très grande variabilité de leurs facteurs de virulence et du pouvoir pathogène associé. En effet, les souches de *S. aureus* peuvent présenter un équipement génétique très variable incluant des déterminants géniques de résistance aux antibiotiques et divers facteurs de virulence acquis par transfert horizontal. A l'heure actuelle, 164 séquences de *S. aureus* sont disponibles correspondant essentiellement à des souches d'origine humaine, le plus souvent résistantes à la méticilline, nosocomiales ou communautaires (Genomes Onlines Database, GOLD). Parmi les souches d'origine animale séquencées se trouvent deux souches d'origine bovine, RF122 (renommée ET3-1) et Newbould 305, cette dernière ayant été séquencée durant cette thèse (Herron-Olson et al., 2007 ; Bouchard et al., 2012). Le développement des méthodes de séquençage à haut débit a permis de caractériser la diversité intra-spécifique chez *S. aureus*. Celle-ci s'organise autour d'un ensemble de séquences très conservées au sein de l'espèce appelé le « génome coeur ». Ce noyau conservé est interrompu par des séquences dites variables composant le génome accessoire qui comprend entre autres les éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, îlots génomiques, îlots de pathogénicité...) (Chiapello et al., 2005). L'ensemble du « génome coeur » et des régions variables constitue le « pangénome » d'une espèce bactérienne.

L'analyse génomique de cinq souches représentatives de l'espèce *S. aureus* (Mu50, MW2, COL, RF122, MRSA) révèle que le génome central représente en moyenne 84 % du génome et, au sein de ce génome central, les séquences nucléotidiques présentent 98 % d'identité. Toutes les souches séquencées de *S. aureus* contiennent un seul chromosome dont la taille varie de 2,7 à 2,9 Mb (Gautier et Le Loir, 2010). Si la variabilité nucléotidique est faible, la variabilité génomique est importante. Elle est associée à la présence d'éléments génétiques mobiles (=EGM), très souvent porteurs de résistances aux antibiotiques et autres facteurs de virulence apportant un avantage sélectif à la population bactérienne (Novick et al., 2003 ; Fitzgerald et al., 2003). Cette plasticité génomique chez *S. aureus* est à mettre en relation avec une adaptation à l'hôte (Ben Zakour et al., 2008).

Le transfert horizontal chez les bactéries

A l'inverse du transfert dit vertical (transmission de la cellule mère à la cellule fille au cours de la réplication) on distingue les événements de transfert horizontal permettant l'acquisition de séquences exogènes même entre espèces ou souches différentes. Chez les bactéries, on peut citer trois mécanismes majoritairement impliqués dans les phénomènes de transfert horizontal.

- La transformation nécessite que la bactérie impliquée soit naturellement compétente, ce qui lui permet d'assimiler des fragments d'ADN exogènes nus présents dans leur environnement. Ceci n'a jamais été démontré chez *S. aureus*.
- La conjugaison nécessite que la souche soit porteuse d'un élément plasmidique ou intégré dans le chromosome dit « conjugatif ». La souche est alors dite conjugative, et peut, par contact direct entre bactérie donneuse et receveuse échanger des fragments d'acides nucléiques (plasmide ou chromosomique) (Stout and Iandolo, 1990).
- La transduction fait intervenir les bactériophages. C'est le mode majeur de transfert chez *S. aureus*. L'insertion sous forme de prophage dans le génome bactérien permet l'apport de facteurs de virulence à la bactérie hôte, participant ainsi au degré de virulence différent entre les souches (Novick, 2003).

c. Adaptation à l'hôte

S. aureus est une espèce plastique au niveau génomique. Elle tire de cette plasticité (ou variabilité génomique) son extraordinaire adaptabilité à divers environnements et à différents hôtes, ses capacités d'échappement aux défenses de l'hôte et sa capacité de résistance aux antibiotiques. Un grand nombre de facteurs de virulence ont été identifiés dans le génome de *S. aureus* permettant à cette espèce de provoquer des infections d'intensité et de symptômes très variés. Parmi les souches de *S. aureus* isolées, des études ont révélé que les caractéristiques phénotypiques varient en fonction de l'hôte d'origine. Ainsi, six biotypes ont été identifiés : humain, β -hémolytique humain, bovin, ovin-caprin, aviaire-abattoir et non spécifique d'hôte (Devriese, 1984 ; Isigidi et al., 1990 ; Shimizu et al., 1991 ; Peton et Le Loir, 2013). Cette séparation des souches en six biotypes a par la suite été confirmée par l'identification de pulsotypes différents associés à chaque biotype (Hennekinne et al., 2003). Plus récemment, l'utilisation de la technique de Multi Locus Sequence Typing (=MLST) a révélé la prédominance de certains complexes clonaux en fonction de l'hôte. Par exemple, au sein des isolats associés au bétail, un faible nombre de clones a été identifié (Fitzgerald et al., 1997 ; Mc Carthy et al., 2009 ; Sakwinska et al., 2011). Les isolats issus de mammites bovines appartiennent à cinq complexes clonaux dont un, le Complexe Clonal 705, spécifique à l'hôte bovin.

Guinane et al. (2010) ont montré par comparaison génomique que les souches associées aux ruminants sont issues d'une transmission de l'humain à l'animal, donnant naissance à des clones spécifiques aux ruminants par évolution adaptative (Guinane et al., 2010). L'obtention récente des séquences de souches isolées de ruminants (bovins et ovins) contribue grandement à clarifier les phénomènes d'adaptation à l'hôte (Bouchard et al., 2012 ; Le Maréchal et al., 2010 ; Herron-Olson et al., 2007). Ces analyses ont permis l'identification de séquences encore inconnues chez les souches humaines et portées, notamment, par des EGM (Herron-Olson et al., 2007). Parmi ces critères spécifiques d'hôtes présents sur les EGM, l' α -hémolysine et LukM/F'-PV sont majoritairement portés par des souches associées à des mammites gangréneuses (Le Maréchal et al., 2010 ; Rainard et al., 2003). La leucotoxine de Penton-Valentine (=PVL) est un autre facteur de virulence d'origine phagique. Cette toxine est faiblement active sur les neutrophiles bovins alors que Luk M/F' est faiblement active sur les polynucléaires humains (Prévost et al., 1998). Par conséquent, au niveau génomique, il n'est pas étonnant de retrouver le gène codant pour la PVL dans le génome des souches humaines, alors qu'il est absent des souches de ruminants et inversement concernant Luk M/F' (Bouchard et al., 2012 ; Le Maréchal et al., 2010 ; Herron-Olson et al., 2007) (tableau 5).

De nombreux autres facteurs peuvent refléter cette adaptation ou co-évolution entre l'hôte et le pathogène. Parmi eux, nous pouvons citer des gènes ou allèles phagiques comme « l'immune evasion complex » (=IEC, portant les gènes *scn*, *chp*, *sak* et *sea*) mais aussi le « staphylococcal complement inhibitor » (=SCIN) et le « chemotaxis inhibitory protein » of *S. aureus* (=CHIPS) majoritairement associé à l'hôte humain (Van Wamel et al., 2006 ; Rooijakkers et al., 2005 ; Collen et al., 1993). A l'inverse d'autres facteurs, comme l'adhésine codée par le gène *bap*, sont spécifiques des souches isolées de mammites (Le Loir et al., 2003 ; Smyth et al., 2005 ; Cucarella et al., 2004 ; Van Wamel et al., 2006) (tableau 5). De même, la majorité des souches isolées de mammites bovines sont productrices de sphingomyélinase alors que seule une minorité de souches isolés de septicémies ou de portage nasal sont positives à la β -toxine (Aarestrup et al., 1999). Ces observations reflètent l'adaptation évolutive du pathogène face à une pression sélective présente dans un environnement donné (Goerke et al., 2009 ; Fraunholz et Sinha, 2012).

Tableau 5 : Exemples de caractères spécifiques à l'hôte et de leurs déterminants génétiques (d'après Peton et Le Loir, 2013)

Gene/Function	Function	Host-specificity	Genetic support	Reference
<i>vWbp</i>	Plasma clotting	Equine <i>vwb</i> product clots ruminant and equine plasma	SaPleq1	Viana et al. (2010)
<i>Selx</i>	Superantigen	Distinct Vb activation profiles for human and bovine lymphocytes	Core genome	Wilson et al. (2011)
Lack of IEC	Immune evasion cluster	Human niche-specific activity	Φ Av β	Lowder et al. (2009)
Loss of <i>sspA</i> function	Maturation of SspB that contributes to blood clot formation	Absent in poultry strain		Lowder et al. (2009)
Interrupted <i>spA</i>	Adherence to lung epithelium, binding to human platelets, inhibition of opsonophagocytosis resulting from non-specific binding of the Fc region of IgG	Absent in poultry strain	Core genome	Lowder et al. (2009)
<i>lukM-lukF'-PV</i>	Cytotoxicity on neutrophils	Most active leukotoxin on ruminant neutrophils	prophage	Barrio et al. (2006) and Rainard et al. (2003)
<i>lukM-lukF'</i>	Cytotoxicity on neutrophils	Weakly active on human polymorphonuclear cells	prophage	Prevost et al. (1998)
<i>scn</i>	Staphylococcal complement inhibitor (SCIN)	high specificity for their human target molecules/do not react with bovine targets	prophage	Rooijackers et al. (2005)
<i>chp</i>	chemotaxis inhibitory protein of <i>S. aureus</i> (CHIPS)	high specificity for their human target molecules/do not react with bovine targets	prophage	Rooijackers et al. (2005)
<i>sak</i>	staphylokinase	human strains not active on ruminant plasminogen	prophage	Collen et al. (1993)
<i>pvl</i>	Panton and Valentine Leukotoxin	weakly active on bovine neutrophils	prophage	Prevost et al. (1998)

II. Problèmes sanitaires

S. aureus est une bactérie commensale et pathogène de l'Homme et des animaux, provoquant un large spectre d'infections. Chez l'homme, les pathologies associées à *S. aureus*, vont des infections suppuratives ou toxiniques à de graves bactériémies. Parmi les pathologies toxiniques liées à *S. aureus*, on peut citer le syndrome de choc toxique staphylococcique lié à l'action de toxines appartenant à la famille des supertantigènes staphylococciques. *S. aureus* est aussi associé aux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en raison de sa persistance dans les produits alimentaires et de sa capacité à sécréter des toxines (entérotoxines) (Le Loir et al., 2003). *S. aureus* appartient aussi aux bactéries majoritairement associées aux infections nosocomiales (19 %, dont 52 % résistants à la méticilline), avec *Escherichia coli* (25 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (10 %) (Source Inserm :<http://www.inserm.fr/thematiques/microbiologie-et-maladies-infectieuses/dossiers-d-information/infections-nosocomiales>). Dans le règne animal, *S. aureus* cause également un large éventail d'infections. On retrouve dans la littérature scientifique une implication de *S. aureus* dans les infections chez la vache, la chèvre, le mouton, le cochon, le cheval, le chat, le chien et l'oiseau allant de simples infections superficielles de la peau à des infections profondes du tractus uro-génital et mammaire (Peton et Le Loir, 2013) (tableau 6)

Tableau 6 : Infections animales les plus communes causées par les staphylocoques à coagulase positive (d'après Peton et Le Loir, 2013)

Species	Host	Infections
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Bovine	Mastitis, impetigo
	Sheep	Mastitis, dermatitis, mild folliculitis
		Mastitis, dermatitis
	Goat	Mammary Botryomycosis
	Pig	Mastitis, castration wounds
	Horse	Dermatitis, urinary tract infections and abscesses
	Cat, Dog	Dermatitis, abscesses (rare)
<i>S. pseudintermedius</i>	Birds	Turkeys: arthritis, septicaemia
	Dog, Cat	Pyoderma, metritis, cystitis, otitis externa, suppuration
	Bovine	Mastitis (rare)
<i>S. hyicus</i>	Pig	Exsudative dermatitis, arthritis
	Bovine	Mastitis (rare)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	Sheep	Lymphadenitis, abscess disease
	Cat	Cystitis and suppuration
<i>S. delphini</i>	Dolphin	Suppurative skin lesions
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Dog	otitis externa

Dans les élevages de ruminants, l'infection intramammaire causée par *S. aureus* pose deux problèmes majeurs : son aspect contagieux et surtout sa capacité à s'implanter et persister au niveau du réservoir mammaire. La formation de ce réservoir mammaire passe bien sûr par la contamination de la mamelle, mais surtout par sa capacité à former des biofilms bactériens ou sa capacité à envahir les tissus de l'hôte (Cucarella et al., 2004 ; Atalla et al., 2010). Cette dernière propriété est de plus corrélée à la capacité de *S. aureus* à former des variants phénotypiques dit small colony variants qui constituent un état végétatif ou dormant de *S. aureus* lui assurant une survie intracellulaire. A la différence des autres pathogènes, cette capacité de persistance engendre une infection pouvant être chronique, où le pathogène ressurgit à la lactation suivante malgré l'application d'un traitement antibiotique au tarissement.

III. Origine de la contamination

La peau et les muqueuses des animaux à sang chaud constituent la niche écologique de *S. aureus*. Chez l'homme, les fosses nasales, le cuir chevelu et les mains sont les principales localisations (Kloos et al., 1976 ; Watson et al., 2006). Chez les ruminants et plus particulièrement chez la vache, *S. aureus* se retrouve majoritairement dans les naseaux et sur la peau des trayons (Roberson et al., 1994). Il est capable de survivre dans l'environnement direct de l'animal puisque de nombreuses espèces de staphylocoques peuvent être retrouvées dans l'air, dans la salle de traite, la litière et au niveau des lésions cutanées (Roberson et al., 1998 ; Vautor et al., 2003 ; Matos et al., 1991 ; Haveri et al., 2008).

IV. Le cycle infectieux

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons au cycle infectieux de *S. aureus* dans la glande mammaire. Il est très difficile de localiser *S. aureus* lors de dissection de glandes infectées de façon chronique, même durant des infections expérimentales, ce qui complique la compréhension de la pathogénie en contexte mammitaire. Les seules observations faites à l'heure actuelle font état de légères excrétions du pathogène dans le lait et de son isolement à partir de macrophages ayant phagocyté le pathogène. Des lésions de l'épithélium peuvent aussi être observées sans toutefois y observer de colonisation bactérienne. Elles sont souvent associées alors au pouvoir cytotoxique des souches résultant de l'action des toxines sécrétées en amont.

Comme décrit dans le chapitre précédent, la première étape du processus infectieux est la contamination du trayon. Le franchissement du canal du trayon, même par un très petit nombre de bactéries, leur donne accès à la lumière de la glande et suffit à induire une infection mammaire (Poutrel et Lerondelle, 1978). Le canal du trayon est donc central dans la protection de la mamelle. Après l'entrée dans la lumière de la glande mammaire, les staphylocoques vont avoir la capacité de se répliquer dans le milieu lait, malgré certaines conditions non favorables : pression partielle en oxygène faible, composés bactériostatiques. Les étapes suivant la multiplication intraciternale sont des étapes primordiales dans la survie et donc dans la persistance de *S. aureus* dans la mamelle. En absence d'observation et de données claires *in vivo*, ces étapes sont pour l'heure relativement spéculatives. Ces étapes sont l'adhésion à l'épithélium des citernes et des canaux galactophores puis l'internalisation des staphylocoques dans les CEM (figure 8).

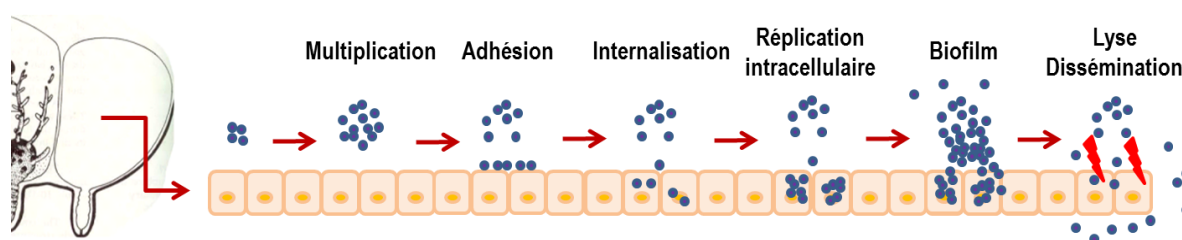


Figure 8 : Cycle infectieux présumé de *S. aureus* dans la glande mammaire (d'après Sinha et al., 2012)

a. Adhésion de *S. aureus* aux cellules du tissu mammaire

S. aureus a la capacité de coloniser les tissus de l'hôte en adhérant aux surfaces abiotiques (par ex. équipements médicaux ou de traite) ou directement aux cellules eucaryotes et aux composants de la matrice extracellulaire. En effet, *S. aureus* peut adhérer à l'épithélium ou l'endothélium de l'hôte via son affinité vis-à-vis de la fibronectine (Fn), du fibrinogène (Fg), de l'élastine, du collagène et du facteur de Von Willebrand (Heilmann C., 2011) (figure 9). Dans le contexte mammaire, plusieurs études *in vitro* ont démontré la capacité de *S. aureus* à adhérer aux cellules épithéliales mammaires (Opdebeeck et al., 1988 ; Almeida et al., 1996). Il a été montré que *S. aureus* possède un fort taux d'adhésion à de nombreuses lignées cellulaires (épithéliales, endothéliales, kératinocytes, macrophages) (Peacock et al., 1999 ; Lammers et al., 1999 ; Dziewanoswska et al., 1999 ; Kintarak et al., 2004 ; Hébert et al., 2000), mais que ce taux varie en fonction de la souche bactérienne sélectionnée et qu'il dépend aussi du fond génétique du donneur de la lignée cellulaire (Frost et al., 1977 ; Hensen

et al., 2000). Cette étape d'adhésion, bien que clairement identifiée sur modèle cellulaire notamment par des études de microscopie, reste difficile à observer sur explants et encore plus sur des prélèvements de tissus infectés. La multitude d'adhésines présentes à la surface de *S. aureus* lui confèrent une forte capacité d'adhésion aux cellules ainsi qu'aux tissus conjonctifs de la matrice interstitielle (figure 9 et figure 10).

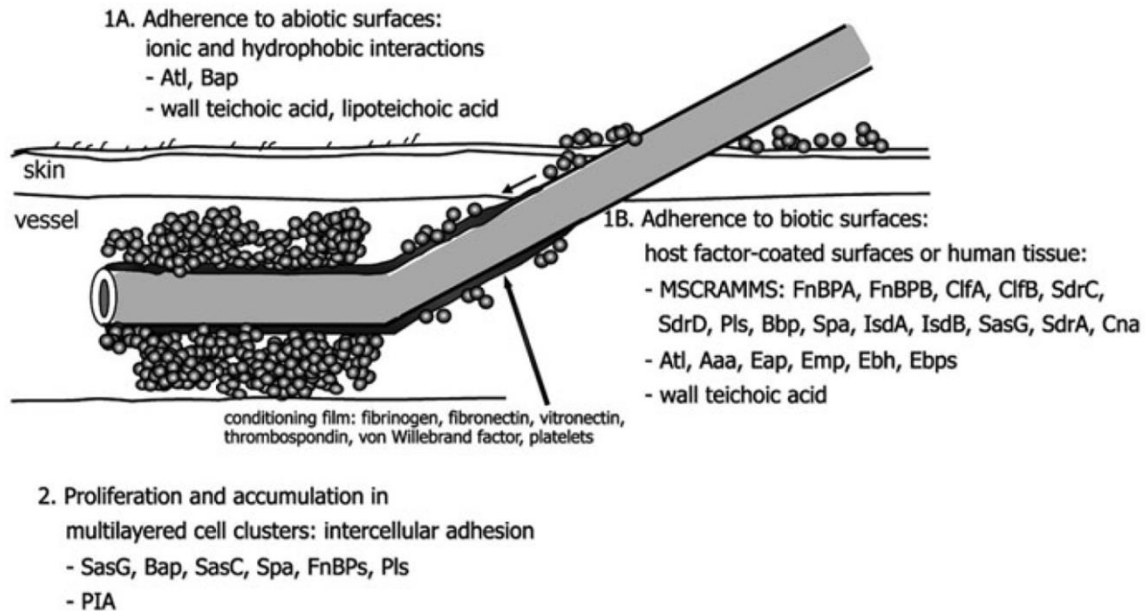


Figure 9 : Protéines staphylococciques mises en jeu lors de la colonisation de surfaces biotiques (tissus) et abiotiques (cathéters) (d'après Heilmann C., 2011)

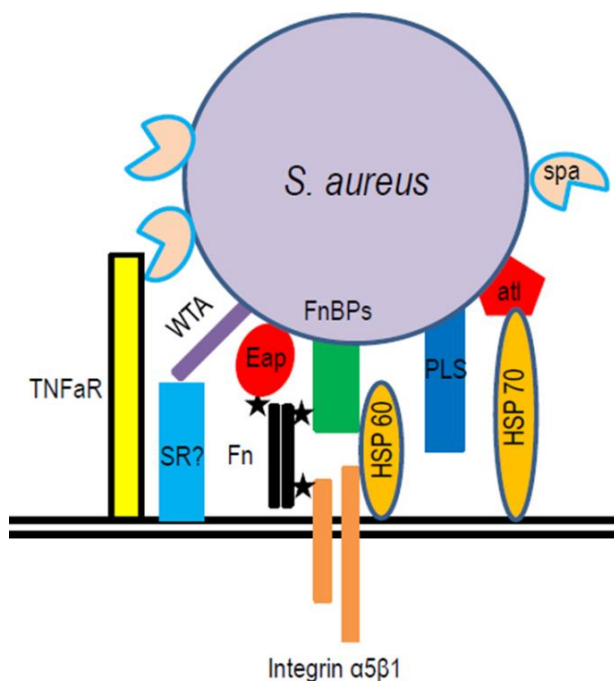


Figure 10 : Représentation schématique des facteurs protéiques staphylococciques impliqués dans l'invasion aux cellules épithéliales de l'hôte (d'après Fraunholz et Sinha, 2012)

b. Internalisation de *S. aureus* aux cellules du tissu mammaire

Suite à l'adhésion, il est probable qu'une partie au moins des staphylocoques soit internalisée au sein des cellules de l'hôte. En effet, la capacité d'internalisation de *S. aureus* dans une variété de cellules de l'hôte a en effet été démontrée. *S. aureus* est aujourd'hui reconnu comme pathogène potentiellement intracellulaire (Almeida et al., 1996 ; Kerro-Dego et al., 2002 ; Sinha et al., 2000 ; 2010 ; 2012). Des études de microscopie à transmission réalisées sur modèles cellulaires ont montré cette capacité de *S. aureus* à internaliser les cellules épithéliales mammaires notamment dans la lignée cellulaire bovine MAC-T où l'internalisation peut être massive (Almeida et al., 1996 ; Brouillette et al., 2003 ; Bayles et al., 1998). Des *S. aureus* isolés de mammites peuvent donc envahir les cellules en culture, et leur taux d'internalisation est généralement corrélé au taux initial d'adhésion (Hensen et al., 2000). A l'heure actuelle, l'internalisation reste cependant controversée dans le cas des mammites car non observée *in vivo*. Les mécanismes mis en jeu lors de l'internalisation de *S. aureus* sont aujourd'hui intensément étudiés et de mieux en mieux caractérisés essentiellement sur modèle cellulaire. La pénétration de *S. aureus* dans les cellules épithéliales mammaires fait intervenir un mécanisme de type zipper, processus d'interaction entre des protéines bactériennes et cellulaires conduisant à la formation de pseudopodes invaginant la bactérie adhérente (Ogawa et al., 1985 ; Almeida et al., 1996 ; Bayles et al., 1998) (figure 11).

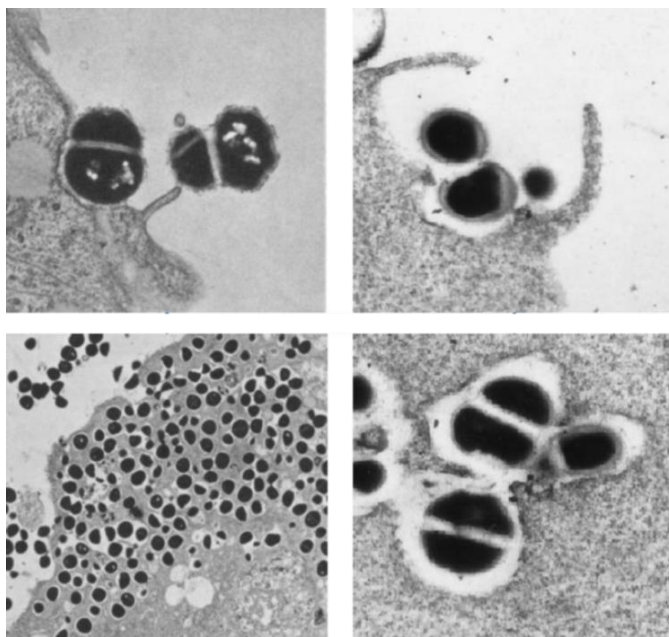


Figure 11 : Observation en microscopie électronique à transmission de l'adhésion et de l'internalisation de *S. aureus* au sein de cellules épithéliales (d'après Ogawa et al., 1985 ; Bayles et al., 1998)

L'internalisation de *S. aureus* passe par un mécanisme d'endocytose faisant appel à des récepteurs spécifiques. En effet, les protéines fixant la fibronectine semblent nécessaires (mais pas indispensables) à l'adhésion et elles sont par contre indispensables à l'internalisation (Lammers et al., 1999 ; Sinha and Fraunholz, 2010 ; Fraunholz and Sinha, 2012). Il a clairement été démontré que des souches mutantes de *S. aureus*, délétées de leurs protéines de liaison à la fibronectine (Fnb A et B) perdent la capacité d'internaliser dans les cellules épithéliales mammaires. Les protéines de liaison à la fibronectine de *S. aureus* permettent d'interagir avec la fibronectine cellulaire présente dans le milieu extracellulaire. Cette interaction primaire entre le pathogène et la fibronectine permet à *S. aureus* d'être en interaction avec des récepteurs spécifiques de l'hôte. Ces récepteurs cellulaires sont des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ présentes à la surface de la majorité des cellules eucaryotes. Les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ sont des points focaux permettant l'ancrage du cytosquelette cellulaire. En effet, les intégrines sont directement reliées au réseau d'actine participant à l'architecture cellulaire. Cette interaction secondaire entre *S. aureus* – Fibronectine – Intégrines $\alpha 5 \beta 1$ entraîne, par une cascade de signalisation, un remaniement de l'architecture cellulaire conduisant à la formation de pseudopodes et donc à l'invagination par endocytose du pathogène (Sinha and Fraunholz, 2010 ; Fraunholz and Sinha, 2012) (figure 12).

c. Vie intracellulaire de *S. aureus* et persistance intramammaire

Le devenir de *S. aureus* et de la cellule infectée va dépendre de la souche impliquée (Krut et al., 2003), mais aussi de la susceptibilité des cellules de l'hôte aux différents facteurs de virulence. La capacité de survie au sein des cellules de l'hôte après son internalisation représente une évolution similaire à celle des pathogènes intracellulaires, favorisant la persistance du pathogène et conférant un aspect chronique à l'infection.

i. Effet cytopathique

Des études récentes ont montré que l'invasion de cellules épithéliales (MAC-T et HeLa) par des souches de *S. aureus* d'origine humaine ou animale avait des répercussions sur le cycle cellulaire de la cellule hôte. En effet, l'invasion par *S. aureus* ralentit la prolifération cellulaire et induit un effet cytopathique (Alekseeva et al., 2013). Les auteurs révèlent qu'une viabilité bactérienne semble nécessaire à l'effet cytopathique qui se manifeste par une transition entre la phase G2 et M plus longue. Ce retard semble favoriser la réplication de *S. aureus*, et donc sa propagation au sein de l'hôte (Alekseeva et al., 2013).

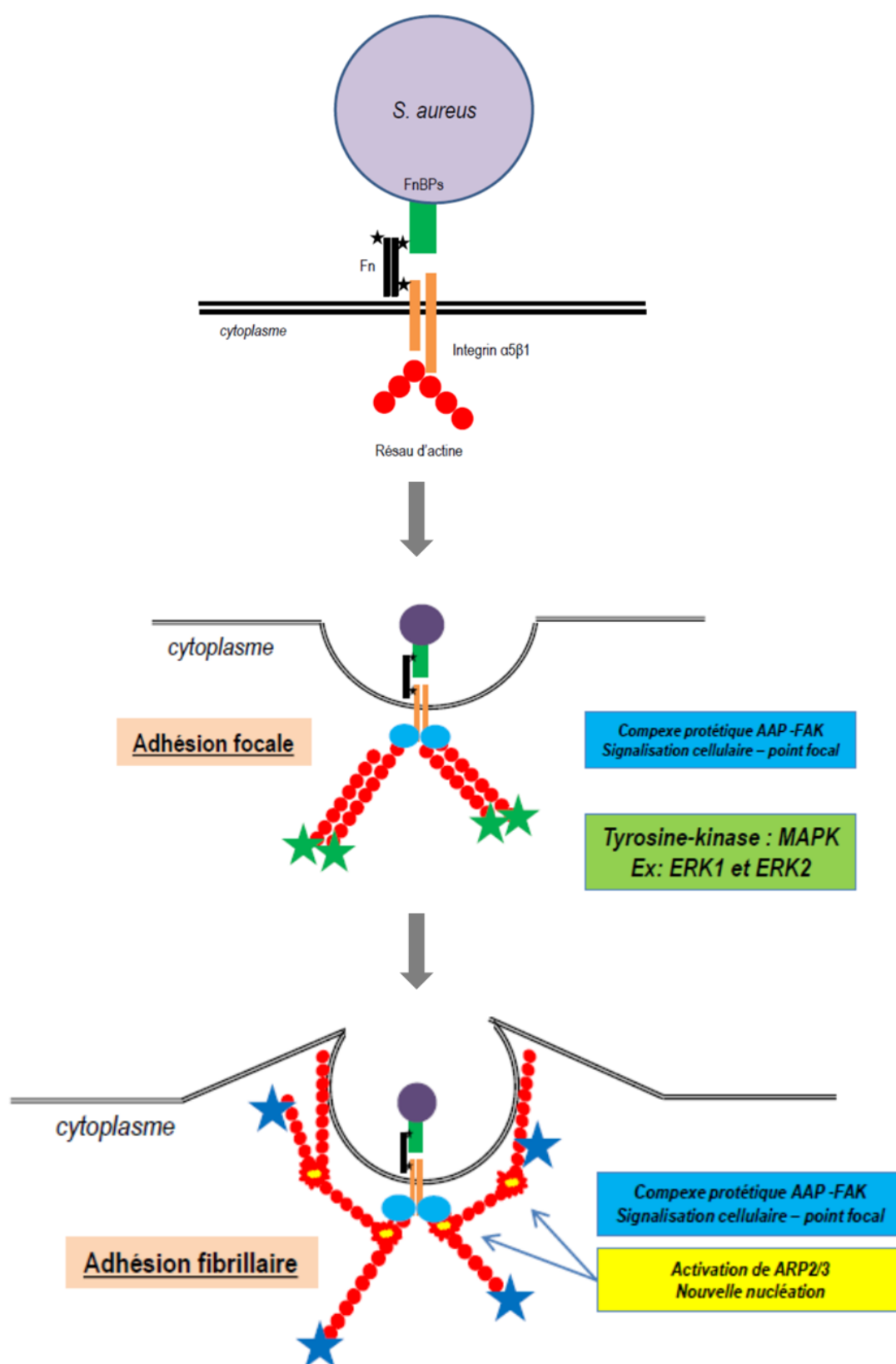


Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction initiale nécessaire à l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales (d'après Sinha and Fraunholz, 2010 ; Fraunholz and Sinha, 2012).

ii. Persistance intracellulaire et « Small Colony Variant »

Une fois internalisées, toutes les bactéries ne vont pas être dégradées sous l'action phagolysosomale mais pourront survivre pour de longues périodes au sein de différentes lignées cellulaires (Lowy et al., 1988 ; Vann et Proctor, 1988 ; Garzoni et al., 2007 ; Tuchscher et al., 2011 ; Sendi et Proctor, 2009) (figure 13).

Dans de nombreux cas et notamment lors de mammites, la persistance des infections est attribuable à la formation de « Small Colony Variant » (=SCV) (Atalla et al., 2010 ; Proctor et al., 1994, Garzoni et al., 2007). Les SCV apparaissent spontanément dans la population de *S. aureus* internalisée et présentent des caractéristiques différentes de la souche parentale : croissance lente, absence de pigmentation, non hémolytique (Proctor et al., 1994). Les études génomiques réalisées sur les SCV révèlent que dans beaucoup de cas, une mutation dans le locus « *agr* », un des régulateurs majeurs de la virulence (cf partie V), entraîne une défaillance dans la production de facteurs de virulence sous contrôle du quorum-sensing (Sendi et Proctor, 2009). Outre une virulence atténuée, le phénotype SCV confère une paroi plus épaisse (Bulger et Bulger, 1967) et une surexpression du facteur sigma alternatif σ_B , permettant une meilleure résistance face aux stress environnementaux (Moisan et al., 2006 ; Horsburgh et al., 2002).

Ces observations confirment le fait que *S. aureus* persiste dans les cellules de l'hôte sous la forme de SCV et participe à la formation de réservoir pour des infections récurrentes (Proctor et al., 1995 ; Sendi et Proctor, 2009). Tel un cheval de Troie, dans le cas des mammites, la pathogénicité des SCV est liée à sa capacité à résister aux défenses de l'hôte et aux traitements antibiotiques avec une tendance à réverter vers le phénotype sauvage lorsque les conditions redeviennent favorables, conduisant à la chronicité de l'infection (Proctor et al., 1995 ; Atalla et al., 2008 ; 2010). Atalla et al en 2008 ont ainsi identifié dans leur campagne d'échantillonnage que 50 % des souches de *S. aureus* isolées de mammites chroniques présentent un phénotype SCV (Atalla et al., 2008).

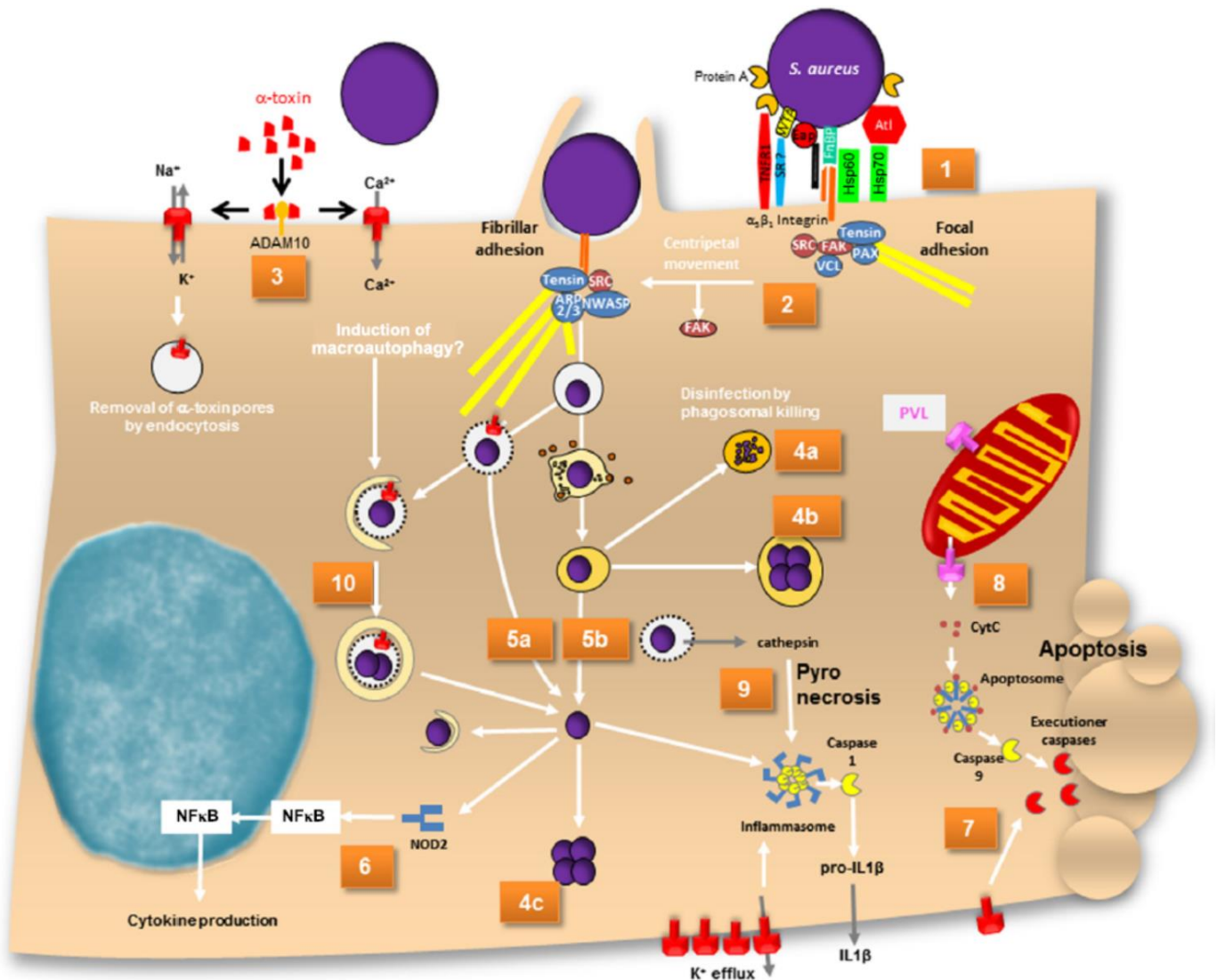


Figure 13 : Représentation de la vie intracellulaire de *S. aureus* (d'après Fraunholz et Sinha, 2012). 1) Adhésion focale initial. 2) Adhésion fibrillaire et endocytose. 3) Formation de pores au niveau de la membrane cellulaire via l'action de l' α -toxine. 4a) Lyse bactérienne via le phagolysosome. 4b) Survie et croissance bactérienne dans l'endosome. 4c) Echappement du phagosome et croissance cytoplasmique via l'action de l' α -toxine et de phospholipases (5a/b). 6) Activation de NF κ B et synthèse de cytokine. 7) Induction d'une mort cellulaire par l'activation des caspases cellulaires. 8) Perméabilisation mitochondriale via l'action de PVL. 9) Activation de l'inflammasome cellulaire suite à la lyse mitochondriale. 10) Réplication bactérienne dans l'autophagosome conduisant à la mort de la cellule hôte. ADAM, metalloprotease and disintegrin; ARP2/3, actin-related protein 2 and 3; Atl, autolysin ; CytC, cytochrome c; Eap, extracellular adherence protein; FAK, focal adhesion kinase; FnBP, fibronectin-binding protein; HSP, heat shock protein; IL, interleukin; NF κ B, nuclear factor κ B; NWASP, neuralWiskott–Aldrich syndrome protein; PAX, paxillin; SR, scavenger receptor; VCL, vinculin; WTA, wall teichoic acid.

iii. Induction de la mort cellulaire

Outre cette capacité de persistance sous forme de SCV, *S. aureus* peut sortir de l'endosome sous l'action notamment de l' α -toxine. Une fois dans le cytoplasme, il peut se répliquer et induire la mort de la cellule infectée pour ensuite se disséminer vers les tissus sous-jacents (Qazi et al., 2001 ; Bayles et al., 1998) (figure 13). Certaines études montrent que la mort cellulaire induite par *S. aureus* est complexe et multifactorielle, mais qu'elle fait majoritairement intervenir un mécanisme caspase-dépendant sous l'action de l' α -toxine et d'autres toxines hémolytiques (Imre et al., 2012 ; Fraunholz et Sinha, 2012 ; Liang et al., 2007 ; 2011). Haslinger-Löffler et al. en 2005 identifient que la localisation intracellulaire de *S. aureus* est indispensable à l'induction de la mort cellulaire (Haslinger-Löffler et al., 2005). Les facteurs de virulence requis pour induire une mort apoptotique semblent être sous dépendance de « *agr* » et du facteur sigma alternatif σ_B (Weeson et al., 1998 ; Qazi et al., 2001 ; Kubica et al., 2008). Cependant *S. aureus* ne semble pas induire un seul type de mort cellulaire, et celle-ci semble dépendante de la souche, de la multiplicité d'infection et du stade de croissance de la souche étudiée (Schwartz et al., 2009 ; Pang et al., 2010 ; Fraunholz et Sinha, 2012). Malgré l'ensemble de ces connaissances, la pathogénèse de *S. aureus* et sa capacité de persistance sous forme de SCV dans les cellules épithéliales mammaires restent mal comprises, notamment par absence de preuve *in vivo*.

iv. Formation de biofilm dans la glande mammaire

En 2006, Anaya-Lopez et al. ont identifié que certaines souches de *S. aureus* isolées de mammites chroniques n'étaient pas capables d'envahir les cellules épithéliales mammaires en culture et en ont conclu que ce critère n'était pas indispensable à la chronicité d'une mammite (Anaya-Lopez et al., 2006). Cependant la découverte des « Small Colony Variant » apporte tout de même une explication cohérente de la persistance et de la chronicité (Anaya-Lopez et al., 2006). Il est tout de même établi que d'autres critères, à la fois bactériens mais aussi propres à l'hôte, participent à la persistance et au phénomène de chronicité. Parmi ces différents critères, on peut citer le fond génétique de l'hôte pouvant conditionner l'infection bactérienne, mais aussi de nombreux facteurs bactériens. Parmi les propriétés bactériennes, la capacité de *S. aureus* à former des biofilms est souvent citée pour expliquer une capacité de résistance accrue et une persistance (figure 14). A une phase plus tardive du processus infectieux, *S. aureus* pourrait en effet développer un biofilm. Selon une étude réalisée en 2004, la possession des deux principaux loci, « *ica* » et « *bap* » permettant la formation de

biofilm serait associée à une propension à induire une mammite moins sévère mais plus persistante et résistante aux traitements antibiotiques. De plus, de nombreuses souches isolées de mammites sont porteuses des deux loci impliqués dans la formation des biofilms (Cucarella et al., 2004).

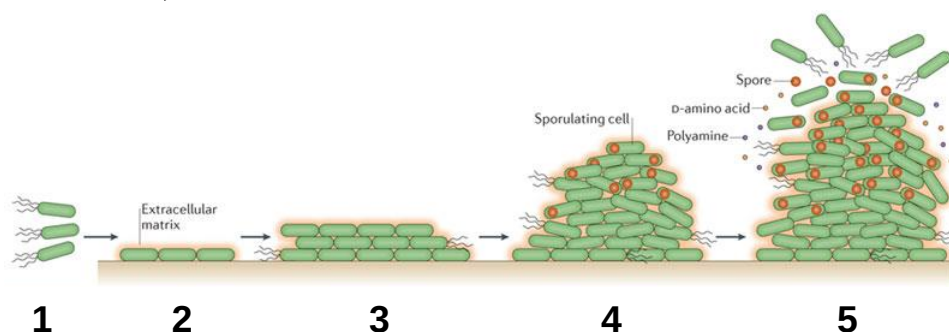


Figure 14 : Représentation schématique du processus de formation d'un biofilm (d'après Vlamakis et al., 2013). 1) Adhésion initiale à une surface biotique ou abiotique. 2) Formation de microcolonies. 3) Mise en place d'une communication de type quorum-sensing. 4) Maturation du biofilm et acquisition de son architecture tridimensionnelle. 5) Équilibre entre population de bactéries à l'état sessile et planctonique favorisant la dispersion et la colonisation de nouvelles niches

V. Les facteurs de virulence associés à *S. aureus*

Le cycle infectieux de *S. aureus* révèle deux grandes étapes, la colonisation et la dissémination vers d'autres tissus, cette dernière impliquant la mise en place de mécanismes d'échappement et de lutte contre le système immunitaire. Les facteurs de virulence de *S. aureus* répondent à ces différentes étapes et leur expression est séquentielle (Lowy FD., 1998). Chez *S. aureus*, les facteurs de colonisation sont d'abord exprimés puis les facteurs de virulence sécrétés contribuant à la dissémination du pathogène dans l'organisme prennent le relais. Cette régulation fine entre facteurs de colonisation et facteurs de virulences se fait notamment via le quorum-sensing et le système « *agr* » (tableau 7 et figure 15).

a. Les MSCRAMMs : « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules »

S. aureus exprime certains facteurs de virulence à sa surface telles les adhésines qui appartiennent à la famille des MSCRAMMs (« Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules »). Ces protéines de surface permettent l'attachement de *S. aureus* à des composants de la matrice extracellulaire ou aux vaisseaux sanguins et contribuent ainsi à la colonisation de l'hôte. Ces protéines sont associées au peptidoglycane par liaisons covalentes et ont des caractéristiques structurales communes (Foster et Hook,

1998). Le peptide signal (S) en position N-terminale permet l'adressage de la protéine néosynthétisée. En position C-terminale, le segment CWA (« cell wall anchor ») comprend notamment un motif LXPTG cible d'une sortase, enzyme assurant le clivage de cette partie C-terminale et la liaison covalente au niveau du peptidoglycane (Mazmanian et al., 1999).

Tableau 7 : Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans les mammites staphylococciques (d'après Le Loir et Gautier, 2010)

Facteurs de virulence	Mécanismes d'action
Adhésines	
Fibronectin-binding protein FnBPA, FnBPB	Adhésion à la matrice extracellulaire Pénétration dans les cellules épithéliales mammaires
Composants de surface	
Microcapsules (CP5, CP8)	Résistance à la phagocytose
Intercellular antigen (ica)	Formation de biofilm ?
Biofilm associated protein (Bap)	Formation de biofilm ?
Acide lipotéichoïque	Réaction inflammatoire
Peptidoglycane	Inflammation, hypersensibilité retardée
Toxines	
Hémolysine alpha	Cytotoxique pour les cellules épithéliales mammaires Cytotoxique pour les polynucléaires Cytotoxique pour les cellules endothéliales Implication dans les mammites gangreneuses
Hémolysine bêta	Cytotoxique pour les cellules épithéliales mammaires
Leucotoxines (hémolysine gamma, LukM/F')	Cytotoxique pour les polynucléaires et les monocytes Implication dans les mammites gangreneuses
Entérotoxines ()	Perturbation de la réponse immunitaire

Les MSCRAMMs les plus étudiées sont les protéines de liaison à la fibronectine (Fnbp A et B), au collagène (Cna) et les protéines de liaison au fibrinogène (Clf A et B). (Signas et al., 1989 ; Vercellotti et al., 1985 ; Holderbaum et al., 1985 ; McDevitt et al., 1997 ; Heilmann et al., 2011).

La protéine A est l'une des adhésines les mieux caractérisées chez *S. aureus*. Elle est capable de se lier au facteur de von Willebrand, un petit peptide présent au niveau de l'endothélium lésé (Hartleib et al., 2000). Il peut, de ce fait, jouer un rôle dans l'adhésion bactérienne en début d'infection. De plus, la protéine A possède un domaine de liaison

capable de se fixer sur le fragment constant (Fc) des immunoglobulines et d'inhiber ainsi la phagocytose par les polynucléaires (Dossett et al., 1969; Forsgren et Sjoquist, 1969). La protéine A est également fortement antigénique et a montré une induction d'une réponse inflammatoire en modèle d'infusion intramammaire (Kumar et al., 2007).

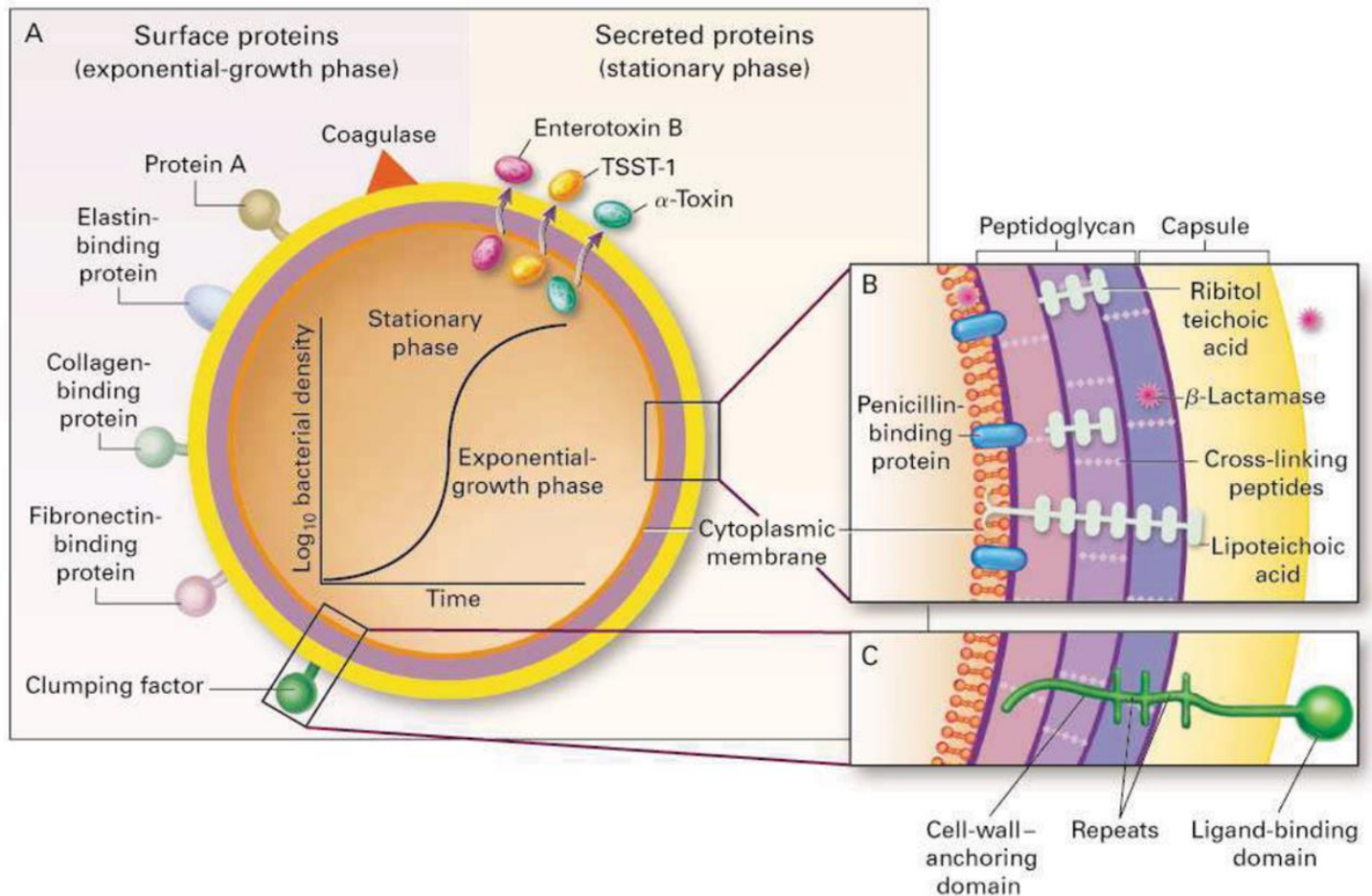


Figure 15 : Représentation de la régulation temporelle de l'expression des facteurs de surfaces et des facteurs sécrétés chez *S. aureus* (d'après Lowy FD., 1998).

b. Les SERAMs : « Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules »

Les protéines appartenant aux SERAMs (« Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules ») peuvent se fixer par des liaisons non covalentes, essentiellement de type hydrophobe, aux protéines de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibronectine, l'élastine... Ces protéines sont impliquées dans de nombreux types d'infections. Parmi ces protéines on peut citer Eap (« extracellular adherence protein »), Emp (« extracellular matrix binding protein »), Efb (« extracellular fibrinogen binding protein ») ainsi que la coagulase (Heilmann C., 2011).

c. Les toxines

S. aureus s'appuie sur un large panel d'enzymes extracellulaires et de toxines capables d'endommager la membrane cellulaire ou les fonctions cellulaires. La majorité des souches de *S. aureus* produit des toxines hémolytiques (hémolysines), ayant une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. Chez *S. aureus*, on distingue les hémolysines α , β , γ et δ . *S. aureus* produit également des exfoliatines (ou toxines épidermolytiques) et des leucotoxines comme la Leucocidine de Panton Valentine (PVL) qui fait partie de la famille des toxines synergohyménotropes (comme l'hémolysine γ) et dont le rôle est controversé dans certaines infections.

d. Les entérotoxines

Les entérotoxines staphylococciques appartiennent à la famille des protéines pyrogéniques. Cette famille de protéines présente des propriétés biologiques communes : pyrogénicité, activation de lymphocytes T. Elles possèdent aussi une activité émétique qui les rend responsables des symptômes associés aux toxi-infections staphylococciques (vomissements, diarrhées, crampes abdominales, prostration...). Les gènes spécifiant ces entérotoxines sont tous portés par des éléments génétiques mobiles (îlots de pathogénicité, prophage, plasmide), à l'exception du gène *seIX* (codant pour une entérotoxine-like de type X) récemment identifié sur le génome central et qui présente par ailleurs des variants en fonction de l'origine humaine ou bovine de la souche (Wilson et al., 2011). Certains gènes d'entérotoxines sont regroupés en clusters (« enterotoxin gene clusters » ; egc) véritables nurseries de gènes à entérotoxines et dont la composition et la structure varient d'une souche à l'autre (Viçosa et al., 2013; Fitzgerald et al., 2001 ; Jarraud et al., 2001 ; Bayles et Iandolo, 1989 ; Altboum et al., 1985 ; Orwin et al., 2001).

S. aureus possède également une capsule extracellulaire, ayant une structure polysaccharidique et produite par plus de 90 % des souches de *S. aureus* (Lee et Lee, 2000). Tout comme pour la protéine A, cette capsule permet à *S. aureus* de mieux résister à la phagocytose et favorise donc l'extension du foyer infectieux (Peterson et al., 1978 ; Fournier et al., 1984; Moreau et al., 1990 ; Heilmann C., 2011).

VI. La réponse immunitaire à *S. aureus* dans la glande mammaire

La contamination de la glande mammaire saine par *S. aureus* induit une réponse inflammatoire. Des infections expérimentales ont montré que la réaction inflammatoire se déclenche, en fonction de la souche et de la taille de l'inoculum, en quelques heures à quelques jours après inoculation. Cette inflammation déclenche le recrutement de polynucléaires neutrophiles puis de monocytes en masse, se traduisant par un comptage de CS dans le lait variable en fonction du temps mais dont la concentration peut dépasser le million de cellules par millilitre (Riollet et al., 2001). La réponse inflammatoire de la glande mammaire est très variable en fonction du pathogène impliqué. Ainsi, les profils cytokiniques induits par des mammites à *S. aureus* ou à *E. coli* sont très différents (Bannerman et al., 2004). La réponse à *S. aureus* se caractérise par la synthèse de TGF- β et IL-8, des cytokines proinflammatoires (Rainard, 2003 ; Rainard et Riollet, 2006).

Cette réponse varie aussi en fonction du type de mammite et les mammites subcliniques n'induisent que peu de cytokines pro-inflammatoires (IL- β et TNF- α notamment) (Riollet et al., 2000 ; Bannerman et al., 2004 ; 2006). Ces cytokines participent à l'immunité de l'épithélium mammaire. Les cellules épithéliales mammaires en interaction avec *S. aureus* peuvent sécréter elles aussi des chimiokines de types IL-8 et TNF- α (Wellnitz et Kerr, 2004). Cette capacité de sécrétion est aujourd'hui de mieux en mieux caractérisée et des études récentes ont démontré la présence de « Toll Like Receptor » de type 2 et 4 à la surface des cellules épithéliales. Par conséquent, les cellules épithéliales mammaires jouent un rôle essentiel de sentinelles dans la glande mammaire.

Bien que participant à l'immunité de l'hôte, les réponses humores sont pourtant limitées contre *S. aureus*. Le complément n'est pas bactéricide sur *S. aureus* et la lactoferrine est peu opérationnelle en milieu lait en raison des fortes concentrations en citrate (Rainard et Riollet, 2006). Parmi les défenses solubles, les défensines sont des peptides inhibiteurs de pathogènes. De nombreux travaux ont identifié l'existence et l'expression de défensines bovines dans la glande mammaire. Parmi les défensines les mieux caractérisées dans la glande mammaire, on peut citer la « Tracheal Antimicrobial Peptide », la « Lingual Antimicrobial Peptide » ou encore la « Béta Defensin 5 » (BNBD 5) (Rainard et Riollet, 2006 ; Goldammer et al., 2004 ; Ryan et al., 1998 ; Luenser et Ludwig, 2005 ; Bougarn et al., 2011).

De son côté, *S. aureus* possède des mécanismes de résistance aux défenses humorales. Ainsi, certaines souches sont capables d'exprimer une capsule qui leur confère une protection contre la reconnaissance par les anticorps. Ces polysides capsulaires (majoritairement de type 5 et 8 chez les souches bovines) (Poutrel et al., 1988) réduisent l'activité bactéricide et l'opsonisation par les polymorphonuclear leukocytes (=PMN) (Sutra et Poutrel, 1991 ; Kampen et al., 2005). De même, la protéine A, la capacité de fixer les anticorps par leur fragment Fc, empêchant ainsi leur activité opsonisante (Fournier et Klier, 2004). *S. aureus* possède également un arsenal de toxines ciblant notamment les cellules du système immunitaire. L' α -toxine, exerce un effet toxique spécifique contre les neutrophiles (Tableau 7). Cependant, les toxines les plus agressives pour les phagocytes sont les leucotoxines (toxines à deux composants formant des pores transmembranaires) (Prévost et al., 2001). Parmi ces leucotoxines, il y a les hémolysines mais surtout LukM/F' très cytotoxique pour les neutrophiles des ruminants (Rainard P., 2007).

VII. Stratégies de lutte contre les mammites

La prévention des mammites est le moyen privilégié et le plus efficace contre les dommages causés par les mammites à *S. aureus*. Les moyens de prévention consistent en premier lieu en une bonne maîtrise de l'hygiène, facteur de risque important. Ceci comprend notamment de bonnes conditions de traite et la désinfection du trayon avec une solution de trempage après la traite (Bushnell, 1984 ; Lam et al., 1997 ; McDougall et al., 2009 ; Zadoks et al., 2001).

En ce qui concerne le traitement des mammites, la pratique courante repose sur l'utilisation d'antibiotiques, malgré une efficacité variable selon les circonstances d'utilisation (de 4 % à 92 % de succès selon les études) (Barkema et al., 2006). L'échec des traitements antibiotiques ne s'explique que partiellement par l'antibiorésistance des souches, dont la prévalence reste faible parmi les souches isolées de mammites chez les ruminants excepté pour la pénicilline (Barkema et al., 2006). Contrairement aux infections humaines, l'utilisation de la méticilline est interdite pour le traitement des mammites chez les ruminants (Rainard et Gilbert, 2010). L'émergence de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques a entraîné l'apparition d'une réticence à l'utilisation des antibiotiques en élevage. Des solutions alternatives ont ainsi été développées, tant pour la prévention que pour le traitement (Le Maréchal et al., 2010).

Développée au début du XX^e siècle, la vaccination fut l'une des premières approches préventive envisagée. Plusieurs types de vaccins ont été réalisés notamment à partir de bactéries atténuées, de sous-unités bactériennes, ou encore d'ADN. Cependant, l'efficacité de la vaccination est en partie conditionnée par les adjuvants utilisés, la voie d'immunisation, le nombre d'injections et la période de vaccination. Aucun vaccin n'a pour l'heure montré de réels effets sur la sévérité ou la fréquence des mammites tant en prévention qu'en traitement. Ces échecs d'immunisation s'expliquent par le fait que *S. aureus* n'induit pas l'acquisition d'une immunité protectrice naturelle dans la glande mammaire (Rainard et Gilbert, 2010 ; Wallemacq et al., 2010). Il est intéressant de noter que de même, aucun vaccin n'est disponible pour l'Homme sur le marché.

La sélection d'animaux naturellement résistants aux mammites est aussi une approche alternative intéressante. Pour l'heure, aucun marqueur de résistance aux mammites n'a été identifié mais certaines régions du génome bovin, définissant des QTL (« Quantitative Trait Loci ») semblent prometteurs pour la résistance aux infections intramammaires (Sorensen et al., 2008). Des vaches génétiquement modifiées ont aussi été développées, notamment par insertion, au sein du génome bovin, d'un gène codant pour la lysostaphine (Wall et al., 2005). En 2006, une autre équipe a proposé une lignée transgénique exprimant une lactoferrine recombinante pour prévenir les mammites à *E. coli* mais sans résultats (Hyvönen et al., 2006). De même, chez les petits ruminants de nombreuses études, notamment de l'INRA, sont menées sur une lignée de brebis naturellement résistante aux mammites (Bonnetfont et al., 2011 ; 2012 ; Rupp et al., 2009 ; Rupp et Boichard, 2003).

En agriculture biologique, l'utilisation d'antibiotiques est très limitée et les éleveurs doivent utiliser des stratégies alternatives telles que l'homéopathie, l'acupuncture, l'utilisation de plantes, de vitamines, de produits à base de lactosérum, d'argile, d'ozone (Loken, 2001 ; Ogate et Nagahata, 2000 ; Ruegg, 2009). Cependant, peu d'études scientifiques solides viennent soutenir et démontrer de réels effets bénéfiques pour la santé de l'hôte vis-à-vis des mammites. D'autres études seront nécessaires pour déterminer le potentiel de telles méthodes.

Enfin, l'utilisation de bactéries lactiques a également été testée, que ce soit pour leurs bactériocines, telle que la Lacticin 3147 (Crispie et al., 2005) ou la nisine (Cao et al., 2007; Sears et al., 1992; Wu et al., 2007) ou pour leur action inhibitrice envers *S. aureus*, en prévention ou en traitement (Crispie et al., 2008; Klostermann et al., 2008). Ces résultats ont montré que l'utilisation de souches de bactéries lactiques, notamment *Lactococcus lactis* DPC3147 comme traitement présentait une efficacité équivalente à celle d'un cocktail

d'antibiotiques classiquement utilisé (Crispie et al., 2008). Cet effet bénéfique sur la santé est majoritairement attribué à la capacité d'immunomodulation des bactéries lactiques. A noter que des études d'innocuité ont été réalisées afin de prouver que l'injection intramammaire de souches de bactéries lactiques n'induisait pas de modification physiologique de la glande mammaire (Frola et al., 2012).

Ainsi, de nombreuses méthodes ont été développées permettant de prévenir ou de traiter les mammites mais aucune ne permet à ce jour d'éradiquer le problème des mammites à *S. aureus*. Une meilleure compréhension de ce qui se passe pendant l'infection dans la glande mammaire paraît indispensable afin de mieux cibler les traitements et de les rendre plus performants.

CHAPITRE I-D

Introduction bibliographique

Le microbiote de la glande mammaire :

« de la notion de microbiote mammaire

Aux mécanismes d'action des probiotiques »

L'utilisation d'antibiotiques en santé vétérinaire a des objectifs variables qui peuvent être de guérir des animaux cliniquement atteints ou de prévenir l'expression clinique de la maladie. L'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux est banni depuis 2006 dans l'Union Européenne. Les traitements antibiotiques permettent de maîtriser les maladies, de restaurer ou de maintenir le bien-être animal et de prévenir la transmission des agents pathogènes aux autres animaux voire à l'homme.

D'autres facteurs peuvent concourir à la maîtrise de certaines maladies, tels que la conduite d'élevage dans le respect des mesures zootechniques et hygiéniques appropriées, l'emploi de vaccins, l'assainissement des troupeaux et la sélection génétique. A cela, s'ajoute une alternative reposant sur l'utilisation de flores barrières afin de prévenir ou traiter les infections par des pathogènes.

I. La notion de microbiote

Le microbiote est le terme désignant l'ensemble des micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) vivant dans un environnement spécifique (appelé microbiome). Par exemple, le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, est constitué de l'ensemble des microorganismes vivant dans l'intestin. Au même titre que le microbiote intestinal, l'existence d'un microbiote a été démontrée pour d'autres niches écologiques corporelles. Parmi eux, nous pouvons citer le microbiote vaginal, cutané (axillaire, du nombril...) et plus récemment mammaire. Le microbiote d'un écosystème humain ou animal est en fait une population mixte de microorganismes vivant dans une certaine harmonie avec son hôte. Ce partenariat peut en effet être positif, neutre ou négatif en fonction de la composition et de l'abondance des populations microbiennes présentes. Ces écosystèmes présentent une forte biodiversité et la liste des espèces microbiennes les constituant s'est largement allongée avec l'avènement des techniques de séquençage haut débit et les approches de type métagénomique.

Ces écosystèmes naturels doivent rester équilibrés, tant en composition qu'en abondance, pour exercer leur rôle positif (par ex. effet barrière). Une dysbiose (perturbation dans la composition et ou l'abondance de l'écosystème) entraîne souvent une fréquence accrue de contaminations et /ou infections par des espèces délétères ou pathogènes (Korecka et al., 2012). L'ensemble de ces données reflète l'importance de ce microbiote dans le

maintien de la santé de l'hôte. La composition du microbiote semble d'ailleurs avoir des répercussions beaucoup plus larges sur la santé voire sur le développement de l'hôte comme les récents travaux sur le microbiote humain semblent l'indiquer (Al-Asmakh et al., 2012 ; Nicholson et al., 2012).

Le microbiote humain et la santé

Le microbiote humain comprend 10^{14} cellules et peut exprimer 100 fois plus de gènes que le génome humain (Human Microbiome Project Consortium, 2012). À la naissance l'intestin est très peu colonisé. C'est au contact de sa mère et de son environnement que le nouveau-né puis l'enfant vont acquérir successivement plusieurs centaines d'espèces bactériennes. Parmi celles-ci, certaines sont bénéfiques alors que d'autres lui sont nocives et occasionnent des désordres digestifs tels des diarrhées (Johnston et al., 2007 ; Rajilic-Stojanovic M., 2013).

Depuis de nombreuses années, la recherche scientifique tente de mieux cerner le rôle joué par les différents microbiotes avec lesquels nous cohabitons. Le microbiote intestinal, notamment, a été largement étudié. On sait de longue date qu'il contribue à la biotransformation des aliments et à réduire le développement de la flore pathogène (Rajilic-Stojanovic, 2013). Il participe aussi à la production de vitamines essentielles. Les effets du microbiote vont bien au-delà de ces aspects « digestifs ». Des études récentes révèlent notamment un lien entre le microbiote, sa composition et certaines maladies ou états physiologiques au sens large comme l'obésité, le diabète, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Le Chatelier et al., 2013 ; Zhao, 2013). L'impact du microbiote va jusqu'à des liens établis avec l'équilibre psychologique de l'hôte (lien avec l'anxiété (Foster et Vey Neufeld, 2013) ou encore le développement embryonnaire (Al-Asmakh et al., 2012).

L'écosystème uro-génital est aussi un écosystème fortement colonisé par une population microbienne riche et diversifiée (Witkin SS., 2007). La flore microbienne normale du tractus urogénital est constituée d'un mélange dynamique de microorganismes aérobie, anaérobie facultative et anaérobie strict. Chez les femmes en âge de procréer, le microbiote vaginal est dominé par les lactobacilles (Witkin SS., 2007). L'abondance des lactobacilles leur confère une influence significative sur l'homéostasie de cet écosystème (De Gregorio et al., 2012 ; Juarez-Tomas et al., 2011). Mais la composition de cet écosystème n'est pas statique et évolue dans le temps notamment en fonction des cycles hormonaux. Diverses perturbations (hygiène insuffisante, traitement antibiotique...) peuvent entraîner des dysbioses et faciliter l'implantation de microorganismes pathogènes bactériens ou fongiques (Witkin SS., 2007). Afin de rétablir l'équilibre et de lutter contre ces infections, l'utilisation de lactobacilles sous forme de probiotiques vaginaux s'est révélée une approche efficace (Zárate et al., 2009 ; De Gregorio et al., 2012 ; Juarez-Tomas et al., 2011).

Tableau 8 : Caractérisation de l'écosystème mammaire : des approches phénotypiques aux approches génomiques.

	Etudes	Objectif	Méthodes d'identification	Flores majoritaires
Phénotypique	Gorini C., 1926	Rôle de la microflore du lait dans la santé de la glande mammaire	Isolement et culture de bactéries sur milieux sélectifs	"Coccus acidoprotéolytique"
	Woodward et al., 1987	Recensement des flores inhibitrices de l'écosystème mammaire	Isolement et culture de bactéries sur milieux sélectifs Identification morphologiques et phénotypiques	<i>Corynebacterium</i> / <i>Staphylococcus</i> / <i>Bacillus</i> / <i>Acinetobacter</i>
	Al-Qumber et al., 2006	Identification des bacilles actifs contre les Gram +		Normal Antimicrobial Producers : <i>Bacillus pumilus</i> / <i>subtilis</i> / <i>licheniformis</i> / <i>thuriengensis</i> / <i>cereus</i>
	Espeche et al., 2009	Etude du microbiote lactique des trayons et de leur potentiel inhibiteur		<i>Streptococcus bovis</i> / <i>Wesseilla paramesenteroides</i> / <i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis</i>
Génomique	Gill et al., 2006	Identification de la microflore des trayons de vaches saines	Clonage et séquençage du gène codant l'ARNr 16S	Staphylocoques à Coagulase Négative et Clostridiaceae
	Braem et al., 2012	Identification du microbiote de l'extrémité des trayons entre vaches saines et à mammites	Denaturatin Gel Gradient Electrophoresis (V3 - rRNA 16S)	<i>Corynebacterium</i> / <i>Aerococcus</i> / <i>Staphylococcus</i> / <i>Streptococcus</i> / <i>Bifidobacterium</i> / <i>Propionibacterium</i>
	Oikonomou et al., 2012	Analyse de la diversité microbienne du lait de vaches en fonction du pathogène impliqués lors de mammites	Pyroséquençage du gène codant l'ARNr 16S	Vaches saines : <i>Streptococcus</i> , <i>unclassified Ruminococcaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Propionibacterium</i>
	Kuehn et al., 2013	Comparaison de la biodiversité microbienne du lait de vaches saines ou de vaches à mammites	Pyroséquençage du gène codant l'ARNr 16S	Vaches à mammites : <i>Brevundimonas</i> / <i>Burkholdeira</i> / <i>Sphingomonas</i> / <i>Stenotrophomonas</i> Vaches saines : <i>Pseudomonas</i> / <i>Psychobacter</i> / <i>Ralstonia</i>

II. Le microbiote mammaire bovin

L'écosystème mammaire, notamment chez les bovins, fait l'objet de plus en plus de travaux. Ces études préliminaires ont montré que la glande mammaire présente une diversité bactérienne et que celle-ci peut participer à l'équilibre et au maintien de l'homéostasie de la glande (tableau 8).

De l'origine du microbiote mammaire bovin...

Les premières données de la littérature scientifique sur l'existence d'une microflore mammaire que l'on a pu identifier remontent au début du XX^e siècle. En effet, le Pr Gorini en 1902 identifie déjà « une microflore mammaire qui existe dans des conditions normales » et qui « participent à la maturation des fromages ». En 1906, à la suite de ces observations, il identifie que la modification de cette flore normale, sous l'action d'une mauvaise traite ou de la contamination de mamelle conduit à l'apparition d'une microflore anormale et persistente pouvant être corrélée à une pathologie mammaire. (Gorini C., 1902 ;1926)

Jusqu'à récemment, l'identification de la biodiversité des différents écosystèmes, notamment mammaire, reposait sur des approches culturelles ou sur des approches moléculaires basées sur le clonage et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Cependant, ces approches ne donnent qu'une vision partielle de l'écosystème en ne sélectionnant que les espèces majoritaires, voire uniquement les espèces cultivables.

Les premières études sur l'identification des microorganismes présents au niveau du trayon dans le cas des vaches laitières ont été réalisées à l'aide d'isollements sur milieu de culture ou via l'utilisation de galeries API (Skoufos et al., 2006; White et al., 1989). Les espèces/genres/familles qui ont ainsi pu être identifiés sont principalement des staphylocoques et notamment des Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) (Gougoulis et al., 2008; Skoufos et al., 2006; White et al., 1989) tels que *S. xylosus* et *S. chromogenes* (White et al., 1989) et des souches du genre *Acinetobacter*, *Bacillus* et *Corynebacterium* (Woodward et al., 1987) (tableau 8).

Plus récemment, le séquençage de l'ARNr 16S à partir d'échantillons prélevés au niveau du canal du trayon de vaches laitières a permis d'identifier 45 unités taxonomiques opérationnelles dont une large gamme de Clostridia, Actinobacteria et Proteobacteria (Gill et al., 2006). Une centaine de souches de bactéries lactiques ont pu être isolées à partir d'échantillons de lait et de prélèvements au niveau du trayon de vaches (notamment *Streptococcus bovis*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*) (tableau 8).

L'arrivée d'une nouvelle génération de méthodes de séquençage à haut débit ouvre la porte à de nouvelles investigations. L'approche métagénomique est aujourd'hui largement mise en oeuvre notamment depuis les projets de caractérisation du microbiote humain (<http://www.human-microbiome.org/>). Récemment, l'utilisation de la technique de pyroséquençage appliquée à des amplicons d'ARNr 16S a permis la caractérisation du microbiote du lait de la femme (Hunt et al., 2011), du rumen et du lait de la vache (Jami et Mizrahi, 2012 ; Oikonomou et al., 2012) (tableau 8).

L'amélioration des connaissances du microbiote mammaire, notamment par les nouvelles technologies de séquençage à haut débit, permettra d'identifier des bactéries bénéfiques ou délétères appartenant au pathosystème de la mamelle.

Il est probable que, comme dans les écosystèmes vaginaux et intestinaux, certaines composantes de la flore bactérienne du trayon puissent agir comme une flore de compétition contre les bactéries pathogènes et faire partie intégrante des mécanismes de défense au niveau du trayon (Fragkou et al., 2007). Parmi ces souches à effet positif sur l'hôte, certaines souches pourraient être utilisées comme probiotique mammaire (Espeche et al., 2009 ; Nader-Macias et al., 2008). Cependant, des études *in vivo* sur modèles bovins seront nécessaires pour étudier l'impact réel de la présence et de la composition de ce microbiote sur la réponse immunitaire et son rôle barrière. Il est important de souligner que parmi les bactéries appartenant à cet écosystème certaines sont des pathogènes opportunistes. Parmi ces pathogènes opportunistes appartenant à l'écosystème mammaire, notons les SCN, très fréquemment retrouvés au niveau du trayon et impliqués dans de nombreux cas de mammite (Gill et al., 2006). L'implication réelle du microbiote du trayon et de la mamelle dans l'équilibre sanitaire de la glande mammaire demande encore à être explorée.

III. Les bactéries lactiques dans les écosystèmes naturels

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de bactéries (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*...) qui ont pour principal trait commun, la capacité de produire de l'acide lactique comme produit final de fermentation des sucres. Longtemps exploitées pour leurs propriétés technofonctionnelles, notamment dans la conception de produits alimentaires fermentés, elles sont aujourd'hui de plus en plus étudiées pour leurs effets probiotiques en santé humaine et animale. En plus de l'effet santé, chez l'animal, cette supplémentation a aussi pour but d'améliorer la croissance (efficacité alimentaire, gain de poids, production de lait) (tableau 9). Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles sont de

loin les plus utilisés en tant que probiotiques, notamment grâce à 36 espèces qui possèdent le statut QPS et/ou GRAS. Initialement le statut de “Generally Recognize As Safe” aux Etats-Unis puis le statut de “Qualified Presumption of Safety” en Europe permettent de garantir l’innocuité des microorganismes avant leur mise sur le marché. Les critères reposent sur un arbre décisionnel comprenant la taxonomie du microorganisme, l’ensemble des connaissances disponibles, sa pathogénicité éventuelle et l’utilisation finale du microorganisme considéré.

Les bactéries lactiques sont retrouvées dans différents écosystèmes, dans des proportions variables. On les retrouve ainsi dans les écosystèmes intestinaux (en faible concentration) et vaginaux (en flore dominante), chez l’humain. Les micro-organismes majoritaires du tractus vaginal bovin sont *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., les entérocoques et les entérobactéries (Rodríguez et al., 2011). Un travail a été mené sur la présence du genre *Lactobacillus* montrant l’importance de cette espèce dans la croissance et la santé des animaux (Otero et al., 2000) (tableau 9). Elles y jouent un rôle bénéfique et peuvent être réintroduites sous forme de probiotiques dans les écosystèmes concernés.

De nombreux agents pathogènes sont capables d'envahir les tissus de l'hôte. Cette capacité, appelée invasion, s'appuie sur les mécanismes de colonisation (adhérence et multiplication), la production de substances extracellulaires, l'internalisation (invasion des tissus) et sa capacité à surmonter ou contourner les défenses de l'hôte. Il a été montré que les bactéries lactiques peuvent moduler à la fois l'expression des gènes de l'hôte (par exemple, la réponse immunitaire, la synthèse de mucus (Jonsson et al., 2001 ; Lebeer et al., 2012) mais aussi l'expression des gènes des bactéries pathogènes (Even et al., 2009). Les bactéries lactiques peuvent également interférer avec l'invasion du pathogène en modulant et ou en compromettant la colonisation et l'invasion des tissus de l'hôte, dans les écosystèmes vaginal et intestinal (Nader-Macias et al., 2008 ; Reid G., 2002 ; Ouwehand., 2002). Les différents modes de compétition comprennent l'interaction directe avec l'agent pathogène avant qu'il n'interagisse avec les cellules de l'hôte (co-agrégation) et la compétition pour un site d'attachement cellulaire (exclusion, concurrence, déplacement). L'utilisation de BL pour lutter contre les bactéries pathogènes ne repose pas seulement sur leurs propriétés bactériostatiques ou bactériolytiques ou bien leurs capacités à concourir pour des niches y compris les tissus de l'hôte mais également sur la capacité à moduler la virulence en inhibant l'expression des facteurs de virulence ou en titrant des toxines. Ces différentes propriétés ne sont pas exclusives les unes des autres et il peut y avoir une synergie dans ces modes d'action qui assure l'effet bénéfique de la souche probiotique sélectionnée.

Tableau 9 : Exemples d'études reflétant l'impact des bactéries lactiques sur la santé des animaux (d'après Bouchard et al., in prep).

Animal	Strains	Tests	Beneficials effects	References
Pigs and Sows	<i>Lactobacillus farminis</i> 3699 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 3698	<i>in vitro</i>	Inhibition of adhesion, dissemination and viability of <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> and <i>Brachyspira pilosicoli</i>	Bernardeau et al., 2009
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>in vivo</i>	Enhance meat productivity, intestinal fermentation and colonization of the gastro-intestinal tractus	Ohashi et al., 2004 Kritas and Morrison, 2007
	<i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>in vivo</i>	Decrease <i>Salmonella</i> portage in gastro-intestinal tractus	Casey et al., 2004
	<i>Enterococcus faecium</i> EK13	<i>in vivo</i>	Decrease of <i>E. coli</i> bacterial count in faeces. Reduce cholesterol and enhance total seric protein	Stompfora et al., 2006
	<i>Bifidobacterium lactis</i> B12 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG	<i>in vivo</i>	Human bacterial probiotics have competitive exclusion against pigs entero-pathogens	Collado et al., 2007
	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB10415	<i>in vivo</i>	Probiotics strains reduce diarrhea associated to pathogens and antibiotics use and reduce the virulence expression of <i>E. coli</i>	Taras et al., 2006
	<i>Enterococcus faecium</i> SF68	<i>in vivo</i>	Reduce cytotoxicity mediated by <i>E. coli</i> during intestinal infections	Scharek et al., 2005
	<i>Bifidobacterium</i> sp <i>Lactobacillus</i> sp	<i>in vivo</i>	Probiotics enhance positive flora implantation after birth et reduce intensity and severity of enterocolitis	Siggers et al., 2008
Poultry	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>in vivo</i>	Enhance meat and eggs productivity. Reduce mortality and nutriment absorption	Torres-Rodriguez et al., 2007 Yoruk et al., 2004 Yamawaki et al., 2013
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>in vivo</i>	Enhance resistance to coccidiosis by enhancing humoral immunity of host	Lee et al., 2007 Tewari et al., 2011
	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	<i>in vivo</i>	Increased the weight gain, the conversion rate and the size of the villi in the ileum	Samli et al., 2007
	<i>Lactobacillus johnsonii</i> F19785	<i>in vivo</i>	Control endemic necrotic enteritis caused by <i>Clostridium perfringens</i> reducing economic losses and the use of antibiotic	La Ragione et al., 2004
	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>in vivo</i>	Decrease <i>Salmonella Enteridis</i> colonization in chicks	Higgins et al., 2008 Chen et al., 2012
Dairy cattle	<i>Lactobacillus</i> sp <i>Bifidobacterium</i> sp <i>Streptococcus</i> sp	<i>in vivo</i> <i>in vitro / vivo</i>	Decrease diarrhea, improved weight gain, reducing health costs. Reduce gastrointestinal and urogenital pathogens colonization	Al-Dobaib et al., 2009 Krehbiel et al., 2003 Otero et al., 2008
	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>in vivo</i>	Elimination of the pathogen in the mammary gland by stimulating the immune system of the host	Klostermann et al., 2008 Crispie et al., 2008
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>in vitro</i>	Reduction of adhesion and internalization of <i>S. aureus</i> into bovine mammary epithelial cells	Bouchard et al., 2013
	<i>Lactobacillus casei</i> OLL2768	<i>in vivo</i>	<i>Lactobacillus casei</i> can act as an immunobiotics to reduce the proinflammatory response during <i>E. coli</i> intestinal infections	Takanashi et al., 2013
Small ruminant	<i>Lactobacillus</i> sp <i>Streptococcus</i> sp	<i>in vivo</i>	Reduction of intestinal carriage of <i>E. coli</i> O157H7, improves food intake and weight	Lema et al., 2001

Les probiotiques

La notion de micro-organismes bénéfiques est née de la découverte et de l'étude de la microflore indigène de l'humain, en particulier du microbiote intestinal, et de son rôle majeur dans la physiologie et la santé de l'hôte. Le concept de probiotique, bien que ce terme n'ait été introduit qu'une cinquantaine d'années plus tard, remonte ainsi au début du XX^e siècle. Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte au-delà du simple apport nutritionnel (FAO–WHO 2001). Ces micro-organismes appartiennent le plus souvent aux bactéries lactiques, notamment au genre *Lactobacillus*, ou *Bifidobacterium*. Les effets exercés par chaque probiotique sont spécifiques des souches sélectionnées et peuvent difficilement être extrapolés aux souches de la même (sous-) espèce ou à d'autres probiotiques. Un probiotique est donc un microorganisme qui doit obligatoirement être administré vivant afin d'exercer son effet dans la zone ciblée et présenter une parfaite innocuité.

Un chapitre de livre est en cours de rédaction sur l'application des bactéries lactiques en production et santé animale (Bouchard et al., in prep). La suite de ce chapitre présente les différents mécanismes d'action des bactéries lactiques probiotiques dans les écosystèmes intestinal, vaginal et mammaire en s'appuyant sur des exemples pris chez l'Homme et l'animal.

IV. Potentiel probiotique et mécanismes d'action des bactéries lactiques dans les écosystèmes naturels (intestinal, vaginal et mammaire)

Les probiotiques ont des effets sur les performances des animaux et leur santé notamment par une action antidiarrhéique, par l'inhibition des bactéries indésirables, la neutralisation des produits toxiques, l'amélioration de la digestibilité et la stimulation des mécanismes immunitaires. Les mammites, les métrites et les diarrhées sont les maladies les plus communes aux animaux d'élevages. Elles peuvent affecter la productivité mais aussi la fertilité des animaux. La majorité des études sur les probiotiques portent sur l'écosystème intestinal ou vaginal chez l'Homme. Très peu d'études mettent en évidence les mécanismes impliqués dans le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques probiotiques chez l'animal. Leur usage est, pour l'heure, essentiellement ciblé sur le tube digestif de l'hôte. Cependant depuis quelques années l'usage de probiotiques dans d'autres écosystèmes (vaginal, mammaire) est évalué ouvrant de nouvelles possibilités thérapeutiques (contre les métrites ou les mammites).

a. Modulation de l'invasion et de la virulence

i. Modulation de l'adhésion des bactéries pathogènes

L'adhésion aux tissus épithéliaux est une étape primordiale lors de la colonisation de l'hôte pour la plupart des pathogènes notamment au sein de l'écosystème intestinal et urogénital. Les BL probiotiques présentent un réel intérêt dans leur propriété à réduire l'adhésion de microorganismes aux muqueuses intestinales et vaginales (figure 16). Les BL peuvent agir sur les muqueuses en stimulant la production de mucus, entrer en compétition pour les sites d'adhésion des pathogènes ou agir directement sur le pathogène lui-même en bloquant son interaction avec l'épithélium, notamment par leur capacité d'auto- et de co-agrégation (figure 16).

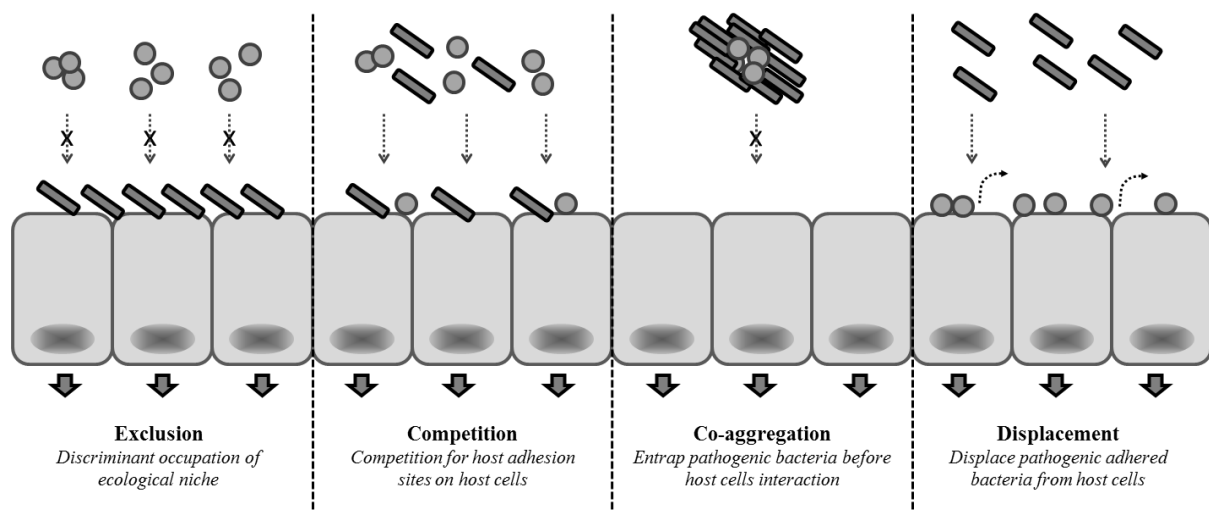


Figure 16 : Représentation schématisée des différents types de compétition pour une niche écologique entre BL et pathogènes.

Chez la femme, une attention particulière a été accordée, au niveau de l'écosystème vaginal, à l'inhibition de l'adhésion exercée par des souches probiotiques, notamment isolées de la flore vaginale saine, contre les agents pathogènes fréquemment associés à des infections urogénitales. Il est en effet prouvé que les espèces de *Lactobacillus* comme *L. acidophilus* peuvent inhiber l'adhésion de souches de *E. coli* uropathogènes à diverses surfaces (Velraeds et al., 1998). Ils peuvent même, comme montré pour une souche de *L. rhamnosus*, déplacer un biofilm d'*E. coli* uropathogène (McMillan et al. 2011). Dans une autre étude, Spurbeck et Arvidson ont montré que *L. jensenii*, *L. gasseri* ATCC 33323, ou *L. gasseri* ATCC 9857 réduisent l'adhérence gonococcique de près de 50 % lorsque les cellules épithéliales sont precolonisées par les lactobacilles. En outre, les lactobacilles ont pu déplacer l'agent pathogène adhérent aux cellules épithéliales, suggérant que ces bactéries lactiques sont

efficaces comme solution prophylatique et thérapeutique (Spurbeck et Arvidson, 2008). La co-agrégation entre lactobacilles et agents pathogènes est un mécanisme qui peut aussi expliquer une telle inhibition de l'adhésion. *L. reuteri* peut par exemple fortement coaggréger avec des souches de *S. aureus* qui produisent la TSST-1, une toxine puissante associée à des cas vaginaux de syndrome de choc toxique, comme cela a récemment été montré et mesuré par microscopie à force atomique (Younes et al., 2012). Ces études ont été menées en vue de caractériser des souches de bactéries lactiques probiotiques vaginaux à destination des femmes. Pour l'heure très peu d'étude ont porté sur des applications en santé animale. On peut citer cependant les travaux de l'équipe de F. Nader-Macias (CERELA, Tucuman, Argentine) qui s'intéresse à la prévention des métrites chez les ruminants par l'utilisation de souches de BL vaginales d'origine bovine (Nader-Macias et al., 2008).

Au niveau de l'écosystème intestinal, les bactéries lactiques ont aussi démontré leur potentiel à entrer en compétition avec les agents pathogènes pour l'adhésion et la colonisation des muqueuses de l'hôte (Gueimonde et al., 2006). Plusieurs études *in vitro* rapportent une inhibition par adhésion compétitive entre des bactéries entéropathogènes et des bactéries lactiques probiotiques. Ces études ont été réalisées sur des cultures cellulaires (lignées cellulaires intestinales) et ou de mucus intestinal d'origine humaine. Par exemple, l'adhésion de *Enterobacter sakazakii* au mucus intestinal a été inhibée par différentes souches de probiotiques testés seules ou en combinaison (*Streptococcus thermophilus* NCC 2496, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461, *Bifidobacterium longum* NCC 3001 et *Bifidobacterium lactis* NCC 2818 (Collado et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que des souches *L. gasseri* peuvent concurrencer de manière significative l'adhésion au mucus de *E. sakazakii* et de *Clostridium difficile* (Ferreira et al., 2011). Dans tous ces cas, il semble que les capacités de coagrégation des BL probiotiques avec les entéropathogènes sont impliquées dans l'effet inhibiteur. *Lactobacillus salivarius* CPI 23174, *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1.557, *L. rhamnosus* ATCC 53103 et *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 peuvent entrer en concurrence avec *S. aureus* dans des tests d'adhérence sur des cellules Caco-2. Cette inhibition implique probablement des propriétés de surface des bactéries, comme l'hydrophobicité, l'autoagrégation et la capacité de coagrégation qui sont communes aux souches de *Lactobacillus* testées. Le phénomène est toutefois dépendant de l'état des bactéries (concentration, phase de croissance de la culture) et des conditions de co-incubation (Ren et al., 2012).

Plus généralement, les déterminants géniques impliqués dans l'adhésion des lactobacilles à la surface des cellules sont bien explorées et plusieurs gènes peuvent maintenant être examinés pour sélectionner les candidats probiotiques. Ces gènes codent pour des protéines qui sont directement impliquées dans l'adhésion telles que des protéines de liaison au mucus, la protéine liant la fibronectine, la protéine de liaison au collagène, l'énolase, la protéine de choc thermique 60 et de nombreuses sortase (Turpin et al., 2012).

ii. Modulation de l'invasion des bactéries pathogènes

Au niveau d'un écosystème, comme l'écosystème intestinal ou vaginal, les pathogènes sont confrontés à des environnements hostiles. Ces environnements incluent des activités physiologiques comme la production d'acides biliaires, d'acides organiques ou encore de peptides antimicrobiens. L'ensemble de ces conditions environnementales créent des obstacles aux pathogènes. Ces derniers élaborent des stratégies de survie et d'échappement, notamment par l'internalisation dans les cellules de l'hôte. Certains des agents pathogènes les plus importants sont des pathogènes intracellulaires (obligatoires ou facultatifs ; par exemple *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*). Leur capacité à envahir les cellules hôtes est une étape clé dans le processus d'infection et ou dans leur persistance dans les tissus de l'hôte. L'invasion des tissus de l'hôte repose majoritairement sur l'interaction entre des substances extracellulaires de la bactérie avec des molécules complémentaires présentes à la surface de l'épithélium. La capacité des BL à empêcher l'invasion de pathogènes est donc souvent testée, en particulier contre les agents pathogènes intestinaux (figure 16).

Au niveau de l'écosystème vaginal, de nombreux agents pathogènes sont intracellulaires (ex. *Mycoplasma genitalium*, *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *E. coli* uropathogène). Dans la littérature scientifique, il existe de nombreuses références sur les probiotiques vaginaux. Cependant, il n'y a presque pas de rapports sur la capacité de ces probiotiques vaginaux à interférer avec l'invasion de pathogènes dans les cellules épithéliales de l'hôte. Spurbeck et Arvidson ont adapté un modèle de culture cellulaire *in vitro* pour examiner les effets de souches de lactobacilles sur les interactions gonococciques avec les cellules épithéliales endométriales. Dans ce travail, ils ont noté que la précolonisation des cellules en culture avec des lactobacilles (*L. jensenii*, *L. gasseri* ATCC33323 ou ATCC9857) entraîne une inhibition de l'invasion gonococcique de cellules épithéliales de plus de 60 %. Cette inhibition s'est avérée être indépendante des mécanismes d'adhésion (Spurbeck et Arvidson, 2008).

Dans le contexte intestinal, les infections par des bactéries entéropathogènes peuvent être considérablement modifiées par son microbiote. Il est donc tentant de sélectionner des bactéries lactiques probiotiques et d'évaluer leur potentiel inhibiteur contre divers agents pathogènes. Des résultats intéressants ont également été obtenus avec une souche de *L. acidophilus* (ATCC4356), qui a été en mesure d'inhiber l'adhérence/invasion de *C. jejuni* aux cellules intestinales Caco-2. Plusieurs tests ont été effectués (exclusion, compétition, déplacement) et ont montré que *L. acidophilus* ATCC4356 réduit l'adhésion et l'invasion de *C. Jejuni* aux cellules Caco-2, mettant en jeu des mécanismes de déplacement et d'exclusion (Campana et al., 2012). Les lignées cellulaires productrices de mucus, telles que HT29MTXE12 (E12), fournissent un modèle plus réaliste *in vitro* pour les infections à *C. jejuni*. En utilisant les cellules E12, il a été montré que les souches probiotiques *L. rhamnosus* R0011, *L. helveticus* R0052, *L. salivarius* AH102, *B. longum* AH1205, utilisées seules ou en combinaison, ont réussi à coloniser le mucus des cellules E12 et les cellules sous-jacentes. Ces bactéries lactiques probiotiques ont pu atténuer l'adhésion et l'invasion de *C. jejuni* aux cellules E12. Les conditions requises pour l'inhibition semblent être la viabilité et la précolonisation cellulaire des bactéries lactiques probiotiques (Alemka et al. 2010). Ces études démontrent l'efficacité potentielle des probiotiques pour la prévention et l'atténuation des infections à *C. jejuni* chez l'homme. Ces mêmes capacités d'inhibition des bactéries lactiques probiotiques peuvent être citées à l'encontre d'autres pathogènes intestinaux comme les *E. coli* Entérohaemorrhagiques (EHEC ; Bujnakova and Kmet 2012 ; Eaton et al. 2011), *S. Typhimurium* (Yu et al., 2012 ; Lievin-Le Moal et al., 2011) ou encore *L. monocytogenes* (Archambaud et al., 2012 ; Koo et al., 2012).

Il est intéressant de noter que les effets protecteurs peuvent également être médiés par la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, l'administration orale de *L. casei* CRL 431, avant et après infection par *S. Typhimurium*, induit des variations dans le profil des cytokines et dans l'expression des Toll-like récepteurs (TLR) (Castillo et al., 2011).

iii. Modulation de la virulence des bactéries pathogènes

L'utilisation de bactéries lactiques pour combattre les bactéries pathogènes ne repose pas seulement sur la compétition pour la colonisation d'une niche écologique. Outre cette capacité à bloquer l'adhésion et l'internalisation, les bactéries lactiques ont la capacité de moduler la virulence des souches pathogènes en réprimant l'expression de facteurs de virulences (Toxines, enzymes...) ou par la titration directe des toxines sécrétées (figure 16).

En 2002, Gan et al. décrivent l'utilisation d'un probiotique, *L. reuteri* RC-14 pour inhiber les infections causées par *S. aureus* lors d'implants chirurgicaux (Gan et al., 2002). La capacité d'inhibition de *L. reuteri* RC-14 semble liée à sa capacité à sécréter un biosurfactant qui inhibe significativement l'adhésion de *S. aureus* à l'implant. La caractérisation de ce phénomène inhibiteur a permis d'identifier que cette souche entraîne la répression d'une « staphylococcal superantigen-like protein », la SSL11 chez la souche humaine *S. aureus* Newman. *L. reuteri* RC-14 présente en fait dans son surnageant une molécule capable d'interférer avec le système *agr* de *S. aureus* (Novick et al., 1993 ; Yarwood et Schlievert, 2003). La molécule impliquée est un dipeptide cyclique produit par *L. reuteri* et agissant probablement comme molécule de signalisation responsable de cette baisse de la virulence induite par la souche RC-14 (Li et al., 2011) .

L'interférence des bactéries lactiques avec le quorum sensing et la production de toxines chez *S. aureus* a été également observée par notre équipe. Ainsi, en co-culture avec *S. aureus* sur une matrice fromagère modèle ou en conditions de laboratoire (culture liquide sur milieu chimiquement défini), *L. lactis* est capable de modifier l'expression de plusieurs facteurs de virulence staphylococciques, y compris le système *agr* et certaines entérotoxines, qui sont responsables d'intoxications alimentaires (Cretenet et al., 2011 ; Even et al., 2009). Dans ce cas, la régulation négative de l'expression de l'ARNIII (effecteur du système *agr*) n'est pas médiée par la libération d'un facteur soluble stable dans le milieu, mais requiert la présence même de *L. lactis* vivant en co-culture (Even et al., 2009).

Outre la capacité des bactéries lactiques à empêcher la colonisation de *C. difficile*, par l'inhibition de la croissance et/ou l'adhérence (Naaber et al., 2004), une étude récente a également signalé la capacité de *S. thermophilus* à inhiber la production de la toxine A de *C. difficile* réduisant ainsi sa virulence (Kolling et al., 2012). D'autres études ont été menées *in vitro* en utilisant des cellules Caco-2 et soulignent la capacité d'une souche de *L. delbrueckii* à inhiber la cytotoxicité induite par *C. difficile* (Banerjee et al., 2009).

Dans les écosystèmes humains, de nombreuses études ont ainsi évalué la capacité de plusieurs souches de BL à inhiber la virulence par modification de l'expression des facteurs de virulence ou par titration des toxines. A l'heure actuelle, peu d'études transposent ces observations aux écosystèmes animaux.

b. Stimulation du système immunitaire

Parmi les allégations santé conférées aux souches probiotiques les propriétés d'immunomodulation des BL sont souvent mises en avant. Ces allégations suscitent de grands intérêts suite au lien établi entre l'altération de la microflore de l'hôte, les maladies autoimmunes et l'émergence des allergies. De nombreuses études relatent le rôle crucial du microbiote dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte et la maturation du système immunitaire chez l'enfant (Martin et al., 2004 ; Ouwehand et al., 2002 ; Reid G., 1999). En théorie, la régulation immunitaire se traduit par une homéostasie entre les activités immunitaires humorale et cellulaire, des cellules Th1, Th2 et Th17 qui jouent un rôle central dans le mécanisme de régulation immunitaire. Les lymphocytes Th1 sont responsables de l'immunité cellulaire, ils participent à l'élimination des pathogènes intracellulaires, grâce à l'interféron- γ . Ils activent les lymphocytes T CD8, les cellules NK et les macrophages. Les lymphocytes Th2 sont responsables de l'immunité humorale. Ils vont aider les lymphocytes B à produire des anticorps (IgM, IgE, IgA). Les anticorps ne peuvent être actifs que sur les pathogènes extracellulaires. Les lymphocytes T régulateurs vont arrêter la réponse immunitaire. Les lymphocytes Th17 sont décrits comme étant des Lymphocytes T régulateurs naturels, produits dans le thymus, et des Lymphocytes T régulateurs induits en périphérie. Ils agissent par des contacts cellule-cellule et surtout en produisant des cytokines inhibitrices dont l'IL-10. Chez des individus sains, l'ensemble du système immunitaire est maintenu en homéostasie cependant un déséquilibre entre les acteurs du système immunitaire peut engendrer des maladies. Ces immunopathologies peuvent être indépendantes d'une flore microbienne, cependant de nombreux cas de maladies inflammatoires (du tube digestif notamment) font état d'un déséquilibre de la flore microbienne associée à l'organe touché. Les approches basées sur l'utilisation des probiotiques sont aujourd'hui proposées comme une alternative d'immunothérapie tant en utilisation préventive que curative lors d'anomalies ou pathologies immunologiques. Selon la littérature, les probiotiques, grâce à leurs composants intra et/ou extracellulaires, sont capables d'influencer le système immunitaire par contact avec les cellules immunocompétentes mais aussi par interaction avec les épithéliums de l'hôte, qui vont alors modifier la réponse immunitaire de l'organisme (figure 17). On parle alors de capacités immunomodulatrices des probiotiques dont certaines souches peuvent, par exemple, être pro ou anti inflammatoires, augmentant la résistance aux infections et réduisant aussi les risques d'allergie (Ceslovas et al., 2005). Chez les animaux sains, la supplémentation en probiotique stimule une réponse immunitaire non spécifique et renforce l'immunité de la muqueuse (Ceslovas et al., 2005; Cetin et al., 2005; Scharek et al., 2007) (figure 17).

L'amélioration de la protection immunitaire des muqueuses est souvent corrélée avec la propriété des bactéries lactiques à améliorer l'intégrité de l'épithélium mais aussi à favoriser le transport de protéines et l'absorption de glucose intestinal (Loderman et al., 2006). Plusieurs exemples montrent ces effets directement *in vivo*, notamment chez les modèles souris où l'immunomodulation des souches a permis de réduire la sévérité des infections à *E. coli* O157:H7 grâce à l'amélioration de l'immunité humorale et cellulaire. D'autres études ont montré qu'en application intramammaire, l'activité immunomodulatrice de la souche de *L. lactis* DPC3147 a permis un taux de guérison équivalent à celui d'un traitement antibiotique au cours d'une mammite bovine (Crispie et al., 2008). L'effet bénéfique de cette infusion intra-mammaire a été étudié *in vivo* et il a été montré que la souche sélectionnée stimule la réponse immunitaire (en particulier l'IL-1 β et l'expression du gène IL-8) dans la glande mammaire favorisant l'élimination du pathogène (Beecher et al., 2009).

i. Effets bénéfiques de l'activité immunomodulatrice

L'immunité innée constitue non seulement la première ligne de défense de l'organisme mais elle joue aussi un rôle crucial dans le développement de la réponse adaptative. Dans un modèle murin, plusieurs souches de *Lactobacillus* améliorent l'immunité innée et adaptative par l'activation de la maturation des cellules dendritiques (Christensen et al., 2002). Les lactobacilles peuvent aussi stimuler la synthèse de cytokines proinflammatoires par les cellules professionnelles notamment le « tumor necrosis factor alpha » (TNF α), l'interféron gamma (IFN γ) et l'interleukine 12 (IL12) assurant un maintien de l'homéostasie immunitaire (Cross et al., 2002 ; Maassen et al., 2000 ; Nagafuchi et al., 1999 ; Perdigon et al., 1999 ; 2002) (Fig. 17).

ii. Effets bénéfiques sur l'immunité humorale

La première ligne de défense adaptative au niveau des muqueuses est la présence de tissus lymphoïdes associés à l'intestin. Ces tissus forment des « plaques de Peyers » où les microorganismes pathogènes interagissent avec les cellules spécialisées du système immunitaire et induisent une réponse mucosale (Mac Donal et al., 2003). Les lactobacilles peuvent induire une réponse locale ou systémique par l'activation des cellules dendritiques qui stimulent le relargage de cytokines proinflammatoires et la synthèse d'Immunoglobuline A dans la lumière intestinale (Mohamadzadeh et al., 2005; Vinderola et al., 2006). Il a ainsi été montré que les lactobacilles modulent l'immunité de la muqueuse intestinale, l'expression de cytokines, la maturation des cellules immunitaires et la prolifération lymphocytaire (Drakes et al., 2004).

iii. Effets bénéfiques sur les symptômes de l'allergie

Plusieurs souches de bactéries lactiques produisent des métabolites à propriétés anti-allergiques. Dans certains cas, des bactéries viables ou inactivées par la chaleur permettent de supprimer la synthèse d'immunoglobuline E et diminuent les symptômes allergiques. Ainsi, des souches de *L. paracasei* régulent la balance Th1/Th2 via la maturation de cellules immunitaires (Fujiwara et al., 2004). Cette régulation favorise la production d'IL10 et d'IL12 pour moduler l'immunité innée et acquise (Chiang et al., 2012).

iv. Effets bénéfiques contre les infections bactériennes

Les probiotiques affectent positivement l'hôte en améliorant la balance de la flore intestinale (Fuller et al., 1989). Les probiotiques permettent de créer des conditions défavorables pour le développement des flores pathogènes (Mauntzairis et al., 2007) et à l'inverse favorisent les microorganismes bénéfiques, qui améliorent à leur tour la santé de l'hôte. De nombreuses souches de lactobacilles présentent un effet protecteur pour l'organisme hôte contre une variété d'entéropathogènes incluant *Salmonella* (Gill et al., 2001), *C. difficile* (Billes et al., 1995), *L. monocytogenes* (deWaard et al., 2002) et *E. coli* (Medellin-Pena et Griffith, 2009). Ces effets protecteurs sont conférés par la maturation des cellules du système immunitaire permettant une élimination plus efficace du pathogène (figure 17).

Un autre système de défense est la production de peptides antimicrobiens. Les peptides antimicrobiens sont majoritairement produits par les granulocytes, les monocytes, les macrophages, les plaquettes et cellules épithéliales (figure 17). Chez les bovins, des dizaines de ces peptides ont été décrits comme les β -défensines (BNBD), le « Lingual Antimicrobial Peptide » (LAP) ou le « Tracheal Antimicrobial Peptide » (TAP) (Rainard et Riollot, 2006 ; Selsted et al., 1993 ; Yount et al., 1999 ; Stolzenberg et al., 1997 ; Alva-Murillo et al., 2012). Plusieurs β -défensines sont produites dans la glande mammaire saine (LAP, TAP et BNBD3). Les défensines ont une activité antibactérienne puissante contre *S. aureus* et *E. coli* *in vitro* (Selsted et al., 1993). Lors de mammites staphylococciques, il a été montré une augmentation de l'expression de l'ARNm de la β -défensin 5 de la glande mammaire. Dans la glande mammaire, le rôle de protection de ces peptides reste cependant à documenter. Quelques études *in vitro* ont ainsi identifié que des acides gras à courte chaîne ont la capacité de stimuler la production de peptides antimicrobiens dans la glande mammaire et d'induire une diminution de l'internalisation de *S. aureus* dans les tissus de l'hôte (Ochoa-Zarzosa et al., 2009 ; Alva-Murillo et al., 2012).

v. Effets bénéfiques sur l'intégrité de l'épithélium

Une barrière épithéliale intacte est essentielle afin d'empêcher la pénétration d'antigènes dans la lumière intestinale ou mammaire par exemple (Mac Cormick et al., 2003). La barrière épithéliale est composée de la membrane cellulaire apicale et des jonctions serrées intercellulaires. Le *zonula occludens* (ZO)-1, est une des protéines de jonction serrées les plus importantes. Elle agit comme un lien avec le cytosquelette et d'autres protéines des jonctions serrées. La perturbation de la barrière épithéliale mène à une augmentation de la perméabilité et permet la pénétration des antigènes qui induisent une inflammation. Plusieurs bactéries pathogènes peuvent envahir les cellules épithéliales et détruire les jonctions cellulaires (Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). Les probiotiques ont démontré leurs capacités à protéger la fonction de barrière épithéliale mais les mécanismes impliqués ne sont pas bien compris. Le prétraitement de cellules épithéliales par des souches de *Lactobacillus* empêche notamment la perte d'intégrité de la barrière induite par les pathogènes notamment en augmentant l'expression de la protéine ZO-1 (Johnson-Henry et al., 2008 ; Parassol, et al., 2005 ; Sherman et al., 2005) (figure 17).

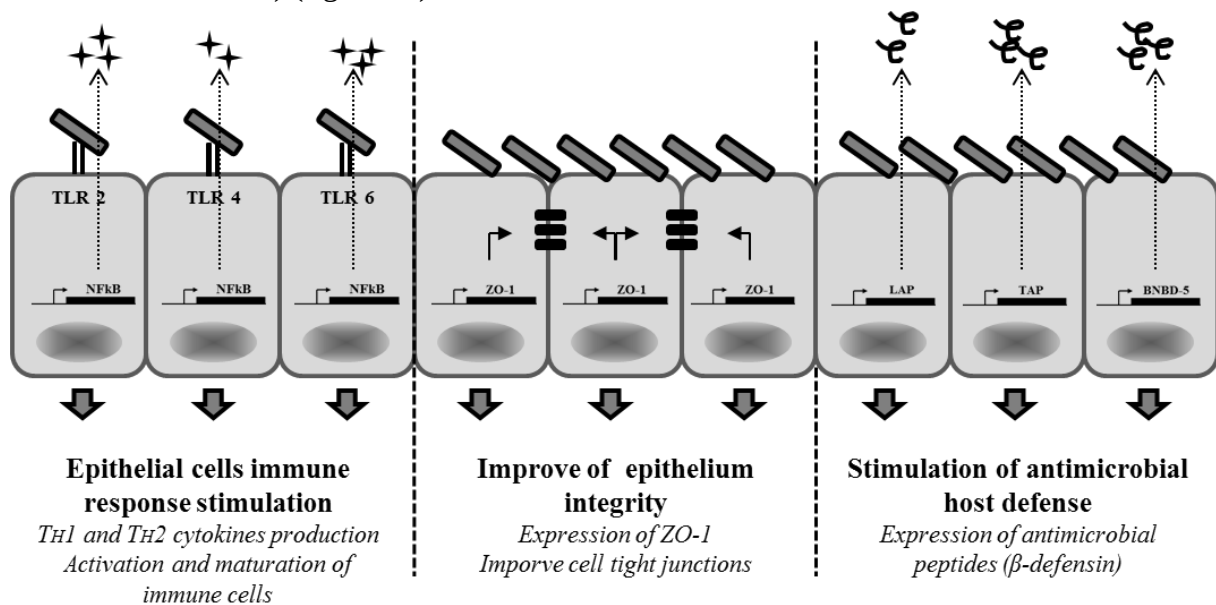


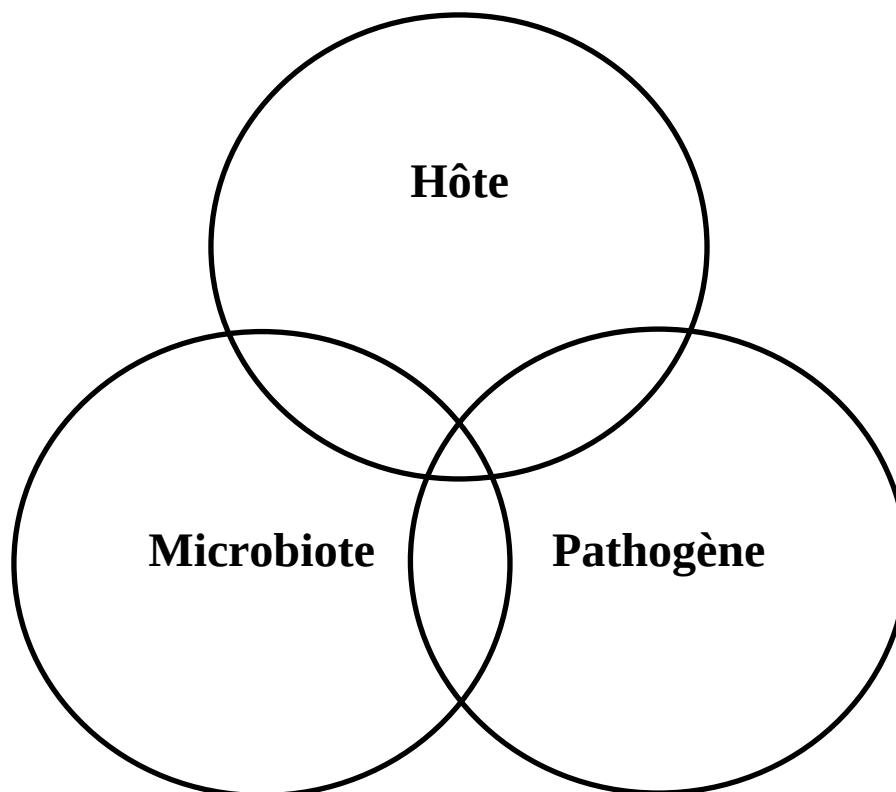
Figure 17 : Représentation schématique de l'impact des BL sur les cellules épithéliales de l'hôte.

CHAPITRE I-E

Questions et stratégie de recherches

Compréhension du pathosystème mammité :

« Interaction tri-partite in vitro »



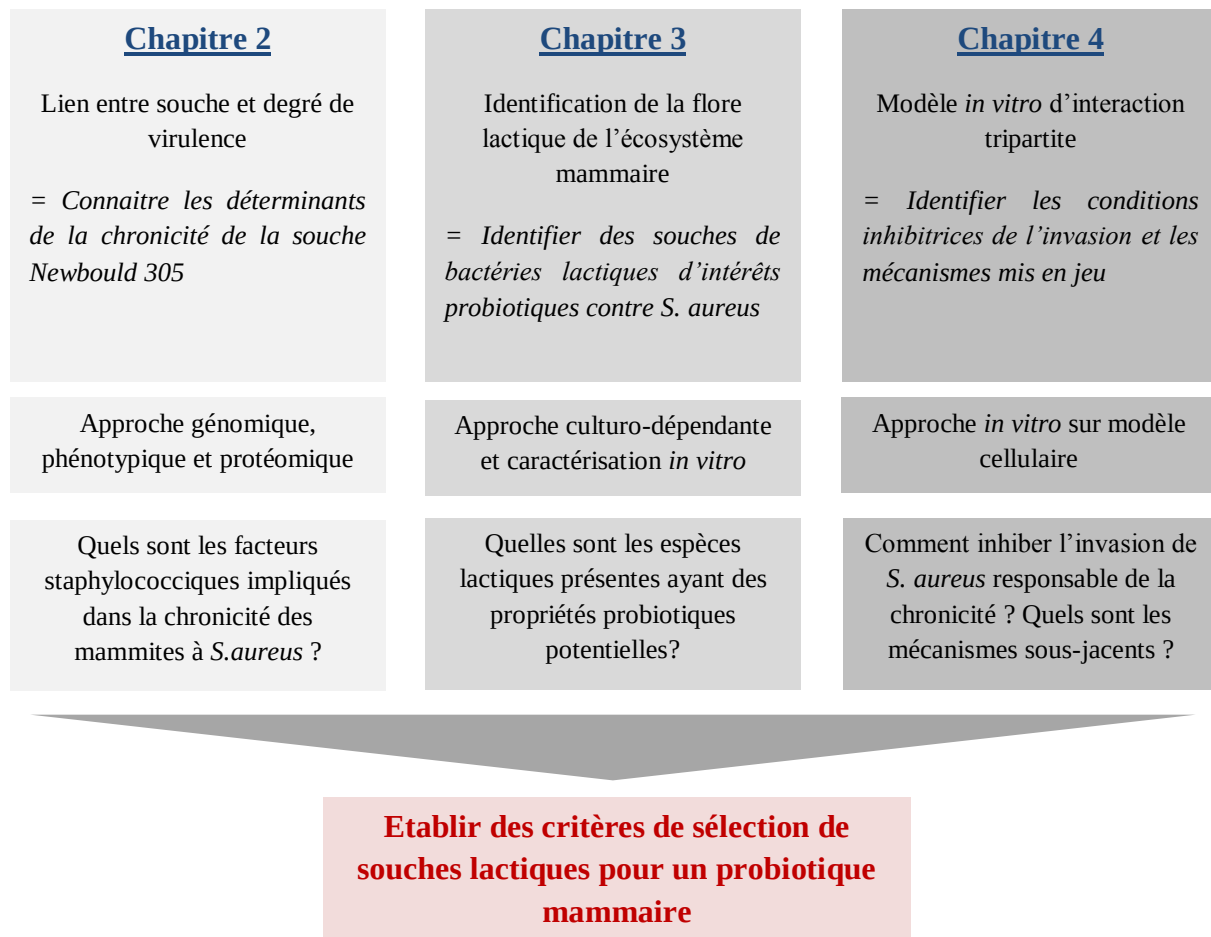
Les mammites représentent un problème économique majeur pour l'ensemble de la filière laitière. *S. aureus* représente l'un des pathogènes les plus problématiques. En effet, outre le caractère contagieux, l'une des spécificités des mammites à *S. aureus* est la chronicité de l'infection, pouvoir lié notamment à la capacité d'internalisation de *S. aureus* dans les tissus de l'hôte. Cependant, malgré la progression des connaissances, les mammites à *S. aureus* restent encore mal connues. En particulier, les processus d'entrée du pathogène dans la glande saine ainsi que le déroulement de l'infection intramammaire font encore l'objet d'hypothèses qui restent à valider. L'ensemble du processus infectieux de *S. aureus* dans la glande mammaire n'a pas été directement observé *in vivo* et les connaissances à ce sujet restent limitées. Plusieurs points du cycle infectieux sont mal compris, comme la capacité de *S. aureus* à échapper aux défenses de l'hôte, à disséminer dans la glande mammaire et surtout à persister dans la glande mammaire.

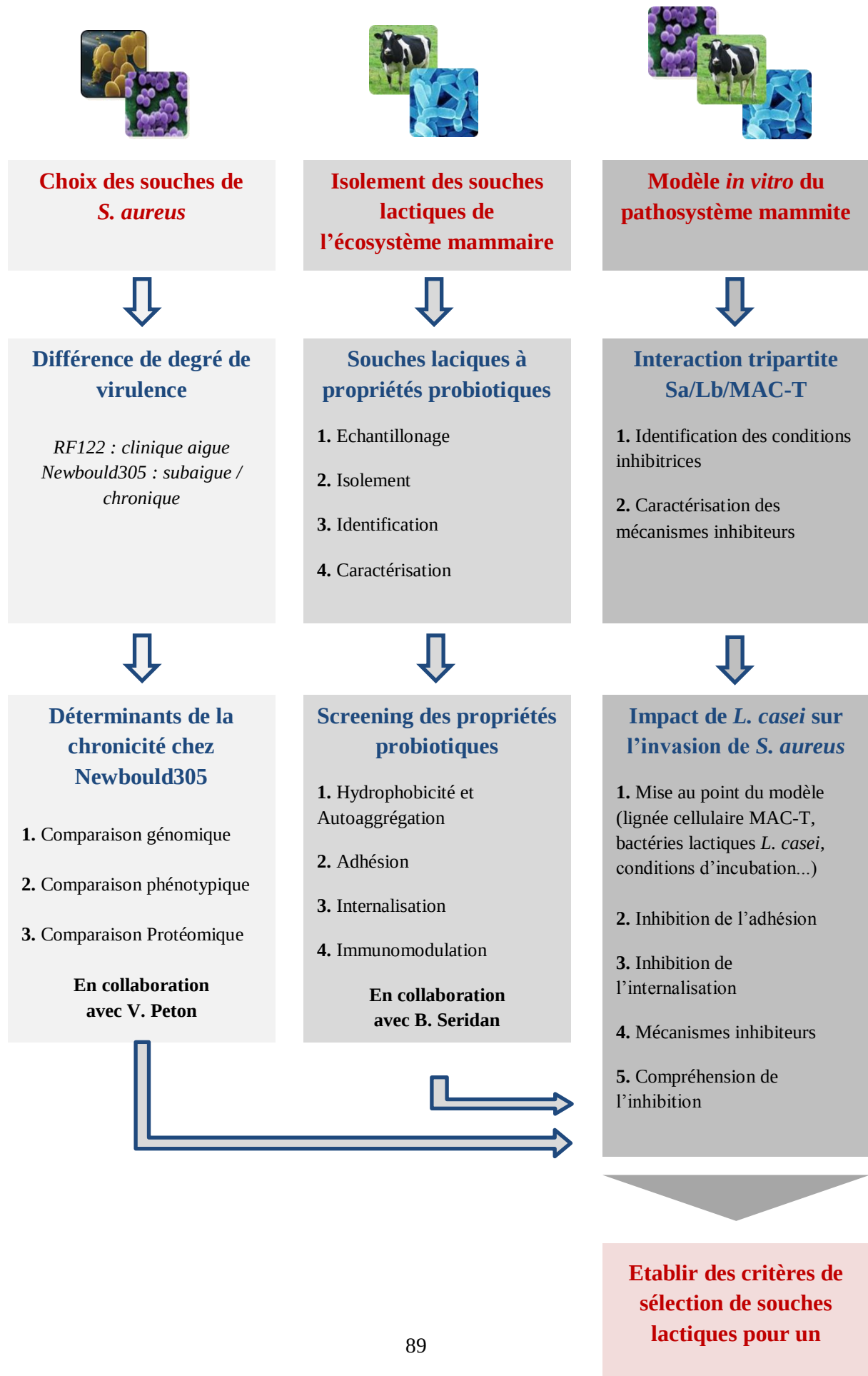
Les stratégies existantes pour la prévention ou le traitement des mammites restent peu efficaces. A l'heure actuelle, l'antibiothérapie reste la solution de référence même si le taux de guérison, pour ce qui concerne les mammites à *S. aureus*, reste faible. De plus l'usage d'antibiotiques en médecine vétérinaire est aujourd'hui limité suite aux nouvelles directives dictées par le plan éco antibio instauré en 2009. Il est donc nécessaire d'améliorer notre compréhension des interactions hôtes-pathogènes et des mécanismes sous-jacents qui les régissent afin de proposer de nouvelles stratégies de lutte.

Dans notre équipe de recherche et durant les années précédentes, des travaux ont été entamés sur les interactions entre des flores positives et *S. aureus* dans des matrices modèles de fromage. Les thèses de Cathy Charlier et de Marina Cretenet ont ainsi mis en évidence que la croissance et la virulence de *S. aureus* étaient affectées lors d'une interaction avec *L. lactis*. Ces travaux ont fait émerger l'idée de transposer cette approche de « lutte biologique » ou d'approche écosystémique au contexte mammaire pour limiter l'impact de *S. aureus* dans les mammites. Cette approche implique de prendre en considération non seulement l'interaction Hôte/Pathogène, mais plus largement le pathosystème et donc le microbiote. Les travaux menés sur d'autres écosystèmes (intestinal et vaginal) révèlent de plus en plus l'importance du microbiote dans l'équilibre de l'écosystème via son dialogue avec l'Hôte mais également via son rôle barrière vis-à-vis des pathogènes.

L'objectif principal est donc de mieux caractériser le microbiote mammaire et notamment la composante lactique qui, par analogie avec les autres écosystèmes, jouerait un

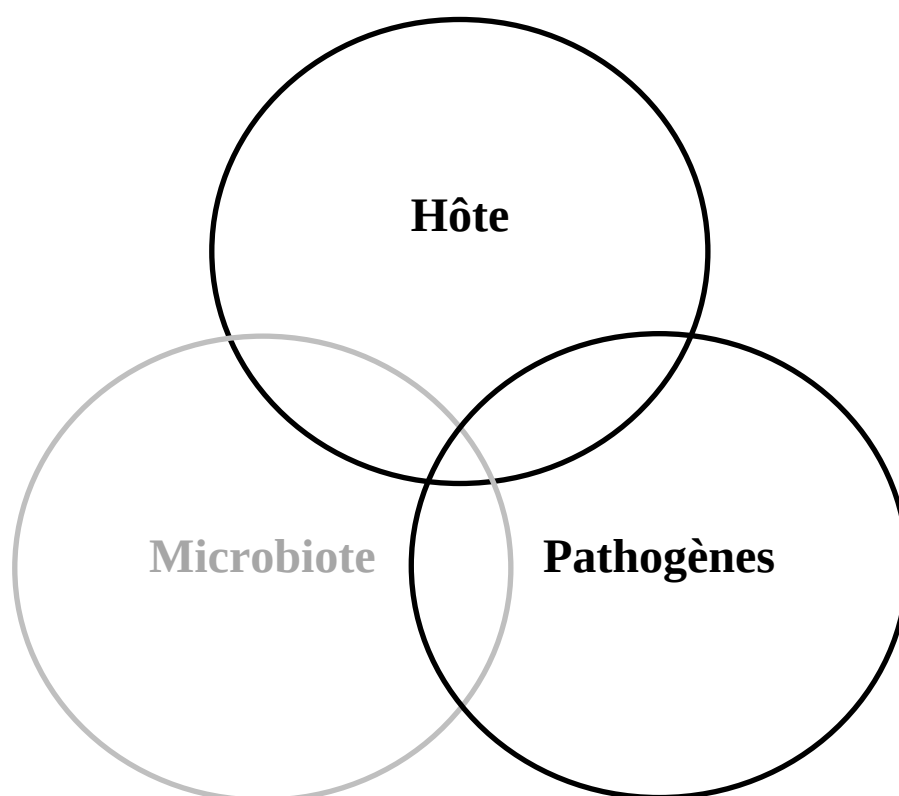
rôle positif sur l'hôte. Les bactéries lactiques ainsi sélectionnées ont été par la suite caractérisées sur leur potentiel probiotique et pourront constituer, à terme, de bonnes candidates pour l'élaboration d'un probiotique contre les mammites staphylococciques (Chapitre 3 : Diversité de la flore lactique mammaire et caractérisation de son potentiel probiotique). Par la suite, nous avons testé la capacité de certaines bactéries lactiques à prévenir l'internalisation de *S. aureus* puisqu'il s'agit de l'une des étapes clés avancées pour expliquer la chronicité des infections staphylococciques (Chapitre 4 : Inhibition de l'invasion de *S. aureus* par *L. casei*). L'ensemble de ce travail a été réalisé avec deux souches de *S. aureus* très différentes au niveau des tableaux cliniques engendrés. La souche RF122 est la première souche bovine séquencée et est considérée comme très virulente. Nous avons voulu introduire la souche *S. aureus* Newbould 305, une autre souche largement documentée et qui induit, de façon reproductible, des mammites modérées et chroniques. Nous avons donc séquencé et caractérisé de manière un peu plus approfondie cette souche afin d'identifier par comparaisons génomique, protéomique et phénotypique avec la souche RF122 ses spécificités (Chapitre 2 : Comparaison de souches de *S. aureus*). Ces différentes parties permettent de présenter le projet de recherche qui s'articule en 3 étapes développées ici en 3 chapitres.





CHAPITRE II

Lien entre variabilité et chronicité des souches de *S. aureus*



Comme nous l'avons vu précédemment, chez les ruminants laitiers, la glande mammaire est le principal réservoir de *S. aureus*. La capacité à survivre et persister au sein des tissus de la glande mammaire est une des hypothèses plausibles pour expliquer le caractère chronique des mammites à *S. aureus*.

Les souches de *S. aureus* isolées des infections intramammaires peuvent présenter des degrés de sévérités différentes. Plusieurs études *in vivo* ont permis d'établir expérimentalement une corrélation entre certaines caractéristiques de souches de *S. aureus* et un tableau clinique plus ou moins sévère. Dans ce contexte, deux souches de *S. aureus*, RF122 et Newbould 305, isolées de mammites bovines sont particulièrement bien caractérisées et constituent des modèles utilisés en infections expérimentales pour induire, respectivement, des mammites cliniques sévères et modérées (Herron-Olson et al., 2007 ; Newbould et al., 1974). Les mammites subcliniques sont souvent corrélées à une persistance intramammaire avec l'absence de signes cliniques entraînant à long terme une forme d'infection chronique (Almeida et al., 1996 ; 1997 ; Atalla et al., 2010 ; Ferens et al., 2000).

Dans ce chapitre, nous avons utilisé et considéré ces deux souches RF122 et Newbould 305 comme représentatives de souches de degrés de virulence aigüe ou modérée et induisant respectivement des mammites sévères ou modérées. Au départ de ce travail, alors que les deux souches avaient été utilisées dans des infections expérimentales, seule la souche RF122 avait été entièrement séquencée. Nous avons donc entamé un travail de caractérisation fine de la souche Newbould305 pour pouvoir, par comparaison avec RF122, déterminer et comprendre quels sont les facteurs staphylococciques impliqués dans le degré de virulence et plus précisément quels sont les caractéristiques impliquées dans la chronicité des infections chez *S. aureus*. La stratégie suivie consiste en la réalisation d'une étude comparative aux niveaux génomique, phénotypique et protéomique. Ce travail s'inscrit plus généralement dans notre objectif de compréhension et de caractérisation des acteurs participant au pathosystème mammitaire, reposant sur l'interaction Hôte-Pathogène-Microbiote. Dans un premier temps, nous avons réalisé le séquençage du génome de la souche Newbould 305, un staphylocoque doré isolé d'un cas de mammitaire clinique bovine en 1958, au Canada (Bouchard et al., 2012). Le génome ainsi obtenu a été comparé à celui de la souche RF122 disponible, lui, depuis 2007.

Dans un second temps, nous avons réalisé plusieurs tests phénotypiques permettant d'identifier les différences susceptibles d'intervenir au cours du processus infectieux induisant

des tableaux cliniques sévères ou modérés. Ces tests ont été réalisés *in vitro* sur modèle cellulaire ou sur la base de divers tests phénotypiques classiques (formation de biofilm ; propriétés de surface).

Enfin, dans un troisième temps, une comparaison protéomique a été réalisée toujours dans le but d'observer les différences entre ces deux souches et de tenter d'expliquer les différences observées *in vitro* lors de nos expérimentations sur culture cellulaire et, par extension, de comprendre les différences de degré de virulence observées *in vivo*, sur modèle bovin.

Dans la littérature scientifique, plusieurs caractéristiques bactériennes sont suspectées d'être impliquées dans la chronicité des infections intramammaires. Parmi les critères responsables d'infections chroniques, trois semblent majeurs et dominants dans l'orientation du degré de virulence : la capacité à former des biofilms, la cytotoxicité et l'invasion tissulaire (Rumi et al., 2013 ; Viana et al., 2010 ; Cucarella et al., 2004 ; Sinha et al., 2012 ; Otto et al., 2013 ; Le Maréchal et al., 2011 ; Heilmann et al., 2011 ; Costerton et al., 1999).

Nous avons donc pris en compte ces trois critères dans notre comparaison génomique (composition en gènes impliqués dans la formation de biofilm, la cytotoxicité et l'invasion cellulaire), dans la comparaison phénotypique (capacité *in vitro* à former des biofilms, pouvoir cytotoxique et capacité d'invasion sur modèle cellulaire) et lors de la comparaison protéomique (protéines sécrétées et membranaires participant à la formation du biofilm et à l'invasion cellulaire). Ces comparaisons entre les souches *S. aureus* RF122 et Newbould 305 nous ont non seulement permis d'accroître nos connaissances sur ces deux souches modèles, mais nous donnent surtout des premiers éléments de réponse quant aux facteurs intervenant dans la chronicité de l'infection observée avec la souche de *S. aureus* Newbould 305.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en 2012 (génomique de la souche *S. aureus* Newbould 305) et d'un article en cours de rédaction dont le manuscrit est présenté dans ce chapitre. Ce travail a été mené en étroite collaboration avec Vincent Peton, doctorant dont l'objectif est d'identifier les déterminants géniques participant au degré de virulence des souches de *S. aureus* en contexte mammaire.

Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated to mild bovine mastitis.

Damien Bouchard^{1,2}, Vincent Peton^{1,2}, Sintia Almeida^{1,2,3}, Caroline Le Maréchal^{1,2†}, Anderson Miyoshi³, Vasco Azevedo³, Nadia Berkova^{1,2}, Lucie Rault^{1,2}, Patrice François⁴, Jacques Schrenzel⁴, Sergine Even^{1,2}, David Hernandez⁴, and Yves Le Loir^{1,2*}.

(1) INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

(2) AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France.

(3) UFMG, ICB, Depto. De Biologia Geral, Belo Horizonte, MG, Brazil (3) ANSES,

(4) Genomic Research Laboratory, University Hospitals of Geneva (HUG), CH-1211 Geneva 14, Switzerland.

† present address : ANSES, F-22000 Ploufragan, France

*corresponding author

Tel +33 (0) 2 23 48 59 04

Fax +33 (0) 2 23 48 59 02

Yves.LeLoir@rennes.inra.fr

Keywords : *Staphylococcus aureus*, ruminant, mastitis, bovine, genome

Abstract

Staphylococcus aureus is a major etiological agent of mastitis in ruminants. We report here the genome sequence of bovine strain Newbould 305, isolated in the fifties from a bovine mastitis and now used as a model strain able to reproducibly induce chronic mastitis in cows.

S. aureus is one of the main pathogens responsible for ruminant mastitis. Staphylococcal mastitis severity is highly variable, ranging from subclinical to gangrenous infection. *S. aureus* strains isolated from bovine or ovine-caprine hosts differ from human isolates as documented previously (Ben Zakour et al., 2008). However, detailed genomic data regarding ruminant isolates are still scarce (Ben Zakour et al., 2008; Guinane et al., 2010; Herron-Olson et al., 2007; Le Maréchal et al., 2011a, 2011b). There is thus a need for genomic data to better understand mastitis and identify bacterial factors responsible for the severity of the disease.

We previously characterized *S. aureus* bovine strain Newbould 305 (ATCC29740;12), which was isolated in 1958, from a clinical case of mastitis in a cow at Orangeville, Ontario (Ben Zakour et al., 2008; Prasad and Newbould, 1968). Newbould 305 reproducibly induces chronic mastitis with mild symptoms in experimental cow mastitis (Bannerman et al., 2004; Hensen et al., 2000). It was previously shown to be clonally related to other bovine strains in ST115 whereas *S. aureus* RF122, another well documented bovine strain (Herron-Olson et al., 2007) associated with severe mastitis symptoms, clustered in ST151 and was more closely related to ovine and caprine strains yet at a considerable genetic distance (Ben Zakour et al., 2008).

We sequenced the Newbould 305 genome using an Illumina Genome Analyzer Hi-Seq 2000 (Fasteris, Geneva, Switzerland). Base calling was performed using the HiSeq Control Soft v. 1.4.8 Pipeline 1.4.0 software. After barcode selection, 12.8 millions of pair-reads of 100 bases in length were obtained. Sequence reads were *de novo* assembled using the Edena assembler version 120430dev (Hernandez et al., 2008). Assembly resulted in 28 contigs (sum=2.79Mbp, N50=503Kbp, max=729Kbp, min=219bp). One of the contig (3379 bases) was reported as a potential complete plasmid. A total of 2755 predicted coding sequences were detected by using Glimmer3 (PMID: 17237039). Over 55 % of the genes were assigned to specific subsystem categories by RAST (Aziz et al., 2008). Gene products were submitted to protein

location prediction using the software package SurfG+ (Barinov et al., 2009). Newbould 305 sequence was compared to that of RF122 (ET3-1) using MUMmer (Kurtz et al., 2004). The overall Newbould 305 genome shares high similarity with that of RF122. The majority of the genes (n= 2518) were common to both strains (e-value 1E-5 and identity > 70 %). A total of 48,371 SNPs were found in Newbould305 when compared to RF122. Among the SNPs located in CDSs, 10,470 were non-synonymous and 1690 corresponded to insertions or deletions. They were evenly distributed among the contigs and did not correlate with protein location. Newbould 305 analysis revealed the presence of a putative prophage containing 45 CDSs (contig 5) and of two putative SaPI containing 16 genes (contig 2) and 17 genes (contig 6). Most of these genes had homology to SaPI genes in *S. aureus* strains of bovine (RF122), ovine (O46), or human (MW2) origin. The contig that was reported as a potential plasmid was further confirmed by homology and was assigned the ID pNewbould305.

Further analysis of Newbould 305 genome is now under way. It will be further compared to RF122 to identify specific factors that might explain the different phenotypes observed in infection acuteness.

Nucleotide sequence accession numbers.

This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession AKYW000000000. The version described in this paper is the first version, AKYW01000000.

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (NABAB project). Authors are thankful to P. Rainard (INRA Tours) who kindly provided the strain. CLM was recipient of an INRA-ANSES PhD grant. SA is recipient of a CAPES-COEFUCUB grant (Project #720/11). DB and VP are recipients of a PhD grant from French Ministry of Research, and INRA and Region Bretagne, respectively.

***Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated to mild and chronic mastitis, is well armed to invade mammary tissue**

Running title: *S. aureus* Newbould 305 invasion into bMEC

Vincent Peton^{1,2} *, Damien S Bouchard^{1,2} *, Sintia Almeida³, Lucie Rault^{1,2}, Hélène Falentin, Julien Jardin, Vasco Azevedo³, Anderson Miyoshi³, Nadia Berkova^{1,2}, Sergine Even^{1,2, †}, and Yves Le Loir^{1,2 †#}

¹INRA, UMR 1253 STLO, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France.

²Agrocampus Ouest, UMR1253 STLO, 85 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brasil

corresponding author

Tel.: +33 (0) 2 23 48 59 04

Fax: +33 (0) 2 23 48 53 50

E-mail: yves.leloir@rennes.inra.fr

†: YLL and SE share credit in senior co-authorship

***: VP and DB equally contributed to this work**

Correspondance address:

Yves Le Loir, UMR 1253 STLO, INRA-Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France

Keywords: *Staphylococcus aureus*, adhesion, internalization, mammary epithelial cells, mastitis, ruminants

Abstract**Background**

S. aureus is a major etiological agent of ruminant mastitis worldwide. Chronicity of *S. aureus* mastitis depends on strain characteristics, and makes this infection difficult to cure and prone to recurrence. To identify bacterial factors involved in chronicity, Newbould 305, a strain that reproducibly induces mild and chronic mastitis in experimental infections was characterized in-depth.

Methodology/Principal Findings

We employed genomic and proteomic approaches, combined to phenotypic characterization, to comprehensively analyze Newbould 305. Results were compared to *S. aureus* RF122, a strain representative of the major clone involved in bovine mastitis worldwide. Variations were found in the content of mobile genetic elements. Newbould 305 presents a gamut of genes encoding toxins, proteases and surface exposed proteins that reflect host-adaptation and invasion capacities. Especially, presence and characteristics of these surface exposed proteins were correlated with higher adhesion and internalization capacities of Newbould 305 into bovine mammary epithelial cells.

Conclusions/Significance

Our data are consistent with the role of invasion into host cells and host-adaptation features in the chronicity of *S. aureus* mastitis. Mobile genetic elements, exoproteins and surface exposed proteins constitute good targets for further research to define the underlying mechanisms of mastitis chronicity.

Introduction

Mastitis is an inflammation of the mammary gland, which most often results from a bacterial infection. Mastitis induces local symptoms and can evolve towards general symptoms and result in systemic infection. Mastitis dramatically impacts animal health, milk quality, and induces considerable economic losses in the milk production chain worldwide (Le Maréchal et al., 2011b). *Staphylococcus aureus* is a major etiological agent of ruminant mastitis, which is often difficult to cure and is prone to recurrence and chronicity (Peton and Le, 2013). There is thus a need to better understand the mechanisms underlying the chronicity phenomenon to efficiently tackle *S. aureus* mastitis. In contrast to *Escherichia coli* mastitis, which severity is mainly determined by host factors and not by the strain features, severity of *S. aureus* mastitis mostly relies on inter-strain variations in terms of virulence potential (Le Marechal et al., 2011a). Severity of *S. aureus* mastitis indeed ranges from subclinical to gangrenous and some *S. aureus* strains reportedly induce chronic mastitis associated with mild symptoms whereas others induce severe mastitis.

Several hypotheses are evoked to explain the chronicity in *S. aureus* mastitis, of which cytotoxicity, biofilm formation and tissue invasion are the most studied. *S. aureus* strains that secrete high levels of Penton-Valentine leucocidin and the alpha toxin are associated with severe but not persistent mastitis (Barrio et al., 2006; Liang et al., 2011; Rainard, 2007). By contrast, a low cytotoxicity might facilitate the persistence of the infection. Biofilm formation might also help *S. aureus* to resist to the antibiotic treatment and the host defenses. The genetic loci *bap* and *ica*, involved in biofilm formation are indeed associated with strains involved in less severe but more persistent mastitis (Cucarella et al., 2004). Finally, the ability to invade and survive intracellularly in mammary epithelial cells might also help *S. aureus* to evade the host immune response. All the evasive tactics *S. aureus* has developed likely influence cure rate by antibiotics and make it a difficult pathogen to treat.

A better understanding of what makes a strain able to induce a chronic mastitis is crucial to find Achille's heel in *S. aureus* pathogenicity and to develop more effective control strategies. To gain insights into *S. aureus* characteristics that correlate with mastitis chronicity, here, we characterized, at the genome, proteome and phenotype levels, *S. aureus* Newbould 305, a strain isolated from a clinical case of cow mastitis in 1958 in Orangeville, Ontario, Canada (Prasad and Newbould, 1968). Later on, Newbould 305 was shown to reproducibly induce mild and chronic mastitis in experimental infections (Bannerman et al.,

2004; Hensen et al., 2000). The results were compared to those obtained for *S. aureus* RF122, a well-characterized bovine strain, which reportedly induce severe mastitis in experimental infections (Herron-Olson et al., 2007) to gain insights into *S. aureus* characteristics that correlate with mastitis chronicity.

Materials and Methods

Bacterial strains, growth conditions

Staphylococcus aureus Newbould 305 (hereafter referred to as N305) (Prasad and Newbould, 1968) and RF122 (renamed ET-3 in Herron-Olson et al., 2007) were isolated from cases of bovine mastitis. These strains are well characterized and reproducibly induce severe (RF122) or mild (N305) mastitis in experimental infections (Herron-Olson et al., 2007; Prasad and Newbould, 1968). Subcultures prior to invasion assays were performed overnight as follows. *S. aureus* strains were grown in brain heart infusion medium (BHI; pH 7.4; BD, Le Pont de Claix, France) at 37°C under agitation (180 rpm). Cultures were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended at different concentrations in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; pH 7.4; D. Dutscher, Brumath, France). Bacterial concentrations in subcultures were estimated by spectrophotometric measurements at 600 nm with a VWR V-1200 spectrophotometer. They were further confirmed using a micromethod as previously described (Baron et al., 2006). *S. aureus* populations (in CFU/mL) were determined on mannitol salt agar (MSA; D. Dutscher, Brumath, France) after 24 h of incubation at 37°C.

Genome comparison of RF122 and N305

N305 strain was fully sequenced using Illumina technique. Whole genome sequencing and assembling strategy are described in Bouchard et al., 2012 (Bouchard et al., 2012). N305 genome sequence was analyzed using SurfG+ to predict protein location (surface exposed, secreted, membrane and cytoplasmic proteins) (Barinov et al., 2009), and PIPS, a pipeline developed to predict pathogenicity islands in bacterial genomes (Soares et al., 2013). Assignment of protein function to CDSs of the two genomes (Newbould and RF122) was performed manually using results from BLASTP, and the COG (Clusters of Orthologous Groups, (Tatusov et al., 2000).

These genome sequences have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession AKYW000000000 (N305) and NC_007622 (RF122).

Analysis of colonization and invasion properties on mammary epithelial cell cultures

The established bovine mammary epithelial cell (MEC) line MAC-T (Nexia Biotechnologies, Quebec, Canada) has been widely used for invasion assays and was retained for this study.

MAC-T cells were cultured in T75 cell culture flasks in DMEM containing 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, and 5 µg/mL insulin (D. Dutscher). Cells were incubated at 37°C in a humidified incubator with 5 % CO₂. They were cultured to a confluent monolayer, treated with 0.05 % trypsin (Gibco-BRL, Grand Island, NY), and suspended in fresh MAC-T medium at a concentration of 2×10^5 cells/mL. For adhesion and internalization assays, cells were then seeded in 12-well plates (2×10^5 cells/well) and incubated overnight at 37°C in 5 % CO₂ to obtain a confluent monolayer.

Adhesion assay

Adhesion assays were adapted from Almeida et al. (Almeida et al., 1996) and modified as follows. Confluent monolayers of MAC-T cells (2.5×10^5 cells/well) were washed twice with PBS and incubated at 37°C in 5 % CO₂ with 1mL of *S. aureus* suspension in DMEM at 2.5×10^6 CFU/mL or 1×10^7 CFU/mL and 2.5×10^7 CFU/mL to achieve a multiplicity of infection (MOI; ratio of *S. aureus* bacterial cells to MAC-T cells) of 10:1, 50:1 or 100:1. *S. aureus* adhesion was measured 1 h postinfection. After incubation steps, MAC-T monolayers were washed four times with PBS and treated by 0.05 % trypsin for 10 min at 37°C. Cells were centrifuged for 5 min at 800g and lysed using 100µL of 0.01 % Triton in sterile water. The population of *S. aureus* that adhered (CFU/mL) was determined using a micromethod as described above.

Internalization assay

Internalization assays were adapted from Almeida et al. (Almeida et al., 1996) and modified as follows. Confluent monolayers of MAC-T cells (2.5×10^5 cells/well) were washed twice with PBS and incubated at 37°C in 5 % CO₂ with 1 mL of *S. aureus* suspension in DMEM at 2.5×10^6 CFU/mL or 1×10^7 CFU/mL and 2.5×10^7 CFU/mL to achieve an MOI of 10:1, 50:1 or 100:1. *S. aureus* internalization was measured 2 h postinfection following an additional 2-h incubation step with DMEM supplemented with gentamicin (100 µg/mL). This step resulted in the killing of extracellular bacteria and allowed the numeration of the internalized bacterial population only. Subsequently, MAC-T monolayers were washed four times with PBS, treated by trypsin, centrifuged for 5 min at 800 g, and lysed in 0.01 % Triton. The population of *S. aureus* that adhered (CFU/mL) was determined using a micromethod as described above.

Phenotype characterization : Biofilm formation and cytotoxic effect

The two *S. aureus* strains were assayed for biofilm formation using the crystal violet staining. Bacteria were subcultured twice in BHI (Labogros, ville, pays) before adjusting the OD600 to 0.004 (corresponding approximately to 10⁶ cfu/ml) in BHI containing 4g/L glucose (named hereafter BHI4), to favor biofilm formation. Growth was performed in microtiter plates with 1 mL of bacterial suspension per well. BHI4 alone was used as negative control. Biofilm staining assays were performed following an incubation step of 24h at 30°C. Microtiter plates were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed for 20min at 80°C and stained for 10 min with 1 % (w/v) crystal violet solution freshly diluted 10-fold in distilled water. Plates were then washed twice with distilled water and allowed to dry at room temperature. The crystal violet was dissolved in acetic acid solution (33 % in distilled water) for 10 min under low agitation. OD was measured at 595 nm using a spectramax spectrometer

To assess their cytotoxic effect, MAC-T cell viability was measured during the incubation with culture supernatant and during the internalization assay (see above) at 24 h and 72 h postinfection using methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) as previously described (Maudsdotter et al., 2011). Briefly, following incubation with DMEM containing 25µg/mL gentamicin, cells were washed and incubated in 0.5 mg/mL MTT in PBS for 4 h at 37°C in 5 % CO₂. The medium was removed, and isopropanol was added for 30 min with shaking at 350 rpm. Absorbance was read at 570 nm with a background at 690 nm. Uninfected cells were used as a negative control (100 % viability), and cells treated with 0.01 % Triton served as a positive control of mortality (0 % viability). Relative viability was expressed with regard to uninfected cells.

2-Dimensional Gel Electrophoresis

For 2D SDS-PAGE, protein samples were prepared as described previously with slight changes (Le Marechal et al., 2011a). Briefly, *S. aureus* strains were pre-cultured in RPMI 1640 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 2-2' dipyridyl (200µM, Sigma) to decrease intracellular iron stocks. Cultures were then diluted 1:100 in fresh RPMI 1640 with deferoxamine (0.15 mM) (Sigma). These conditions are meant to increase the expression of virulence factors due to a low iron bioavailability. *S. aureus* strains were grown without agitation at 37 °C for anaerobic conditions, in 500 mL flasks for supernatant fraction or 50mL tubes for total fraction and shaving. The cultures were centrifuged at 7000 x g for 10

min and the supernatants were filtered through a 0.22µm filter unit. Pellets were kept for protein extraction of total lysate. The proteins were precipitated with 10 % TCA at 4°C overnight. Samples were centrifuged at 9000 x g during 1h at 4°C. Proteins pellets were washed 3 times with ethanol 96 % and dried. Proteins were solubilized in urea 8M. Total cell lysate proteins were obtained as described previously (Le Maréchal et al., 2009).

To analyse surface exposed proteins, a shaving technique was used as described previously (Le Marechal et al., 2011a). *S. aureus* cultures were centrifuged at 7000 x g for 10 min and total cell- and supernatant- fractions were treated separately. The pellets were washed twice with PBS. Bacteria were re-suspended in PBS 5mM DTT enough to reach a 20 OD_{600 nm}. 500µL of this suspension were incubated with 20 µg trypsin during 1h at 37°C with agitation (180 rpm) and then centrifuged at 10000 xg. Supernatants were filtered through a 0.22µm filter and incubated overnight with 1µg trypsin at 37°C with agitation. The trypsinolysis reaction was stopped by adding 15µL of TFA 5 %. Controls showed no significant loss of viability by counting CFUs before and after shaving.

Samples were treated as described previously (Le Marechal et al., 2011a) with minor changes : isoelectric focusing was carried out using pH 4 to 7 (Total proteins) or 3 to 10 NL (exoproteins) 18 cm Immobiline Dry Strips (GE Healthcare, Orsay, France) and the second dimensional separation was performed on the Ettan™ DALT twelve electrophoresis system (GE Healthcare) using 14 % acrylamide separating gels without a stacking gel at a voltage of 70 V for 1h30 and 100 V for about 20 h. Gels were stained with Biosafe (Sigma) according to the manufacturer's instructions.

Images of gels were analyzed using software SameSpot (GE Healthcare). Overexpressed spots with a minimal fold change of 2 and anova e-value lower than 0.005 were selected for mass spectrometry analysis. Treatment of gel pieces was done exactly as described in Le Maréchal et al., 2011.

Identification of proteins

Proteins were identified by NanoLC-ESI-MS/MS and peptides identification was carried out with X! tandem and MASCOT softwares. The database used for proteins identification was composed of predicted proteins based on RF122 and N305 genome sequences (Herron-Olson et al., 2007 ; Bouchard et al., 2012) along with proteins data of *Staphylococcus aureus* (taxon

1280) in the UniProtKB database (<http://www.uniprot.org/>) to obtain a statistically significant identification. To achieve a valid identification with a high degree of confidence, each protein must have a minimum of two peptides corresponding to a P value below 0.05. Auto-validation of peptides from MASCOT search results was performed using the IRMa software (Dupierris et al., 2009). Subcellular localisation prediction of the proteins was achieved with PSORTb 3.0.2 software (<http://www.psort.org/psortb/>). In order to validate proteins for comparison, one of the strains must present at least 2 peptides corresponding to the protein and the other strain has a maximum of one peptide. Validated proteins were then organized by Cluster OG using the EggNOG 3.0 software (http://eggnog.embl.de/version_3.0/).

Results

Comparison of *S. aureus* RF122 and Newbould 305 gene content

To investigate the genetic bases for the chronicity of N305 in bovine mastitis, we determined its genome sequence using Illumina technique (Bouchard et al., 2012). The general features of N305 genome are summarized in Table 1, which also includes general features of RF122 (Herron-Olson et al., 2007). Analysis of N305 genome using the PIPS pipeline (Soares et al., 2013) predicted the presence of 3 *S. aureus* Pathogenicity Islands (SaPIs) on contigs 2, 5 and 6 and which include 19 CDSs highly similar to CDSs of already described SaPIbov4 and SaPIbov5, 25 CDSs highly similar to CDSs of SaPIbov5 and 24 CDSs highly similar to SaPIbov2. PIPS analysis also revealed the presence of two putative bacteriophages, on contig 5, which contain 34 CDSs and 55 CDSs with homology to Bacteriophage 80alpha and bacteriophage 187, respectively. Predicted proteins were functionally categorized using the COGs database. The COGs distributions were similar in the two genomes (Figure 1 in supplemental data). The majority of the genes (n= 2,518) were common to both strains. This core genome covers up to 91.5 % and 94.5 % of N305 and RF122 CDSs, respectively. The comparison of Newbould 305 and RF122 sequences however revealed some differences in their overall genome. A total of 48,371 single nucleotide polymorphism (SNPs) were found in Newbould 305 compared to RF122. Among the SNPs located in CDSs, 10,470 were nonsynonymous and 1,690 corresponded to insertions or deletions. To better understand the genomic features responsible for variability of mastitis severity, we compared gene content of *S. aureus* RF122 and Newbould 305. We focused on genes that are suspected to be implicated in the chronicity of infections, i.e. genes reportedly involved in the biofilm formation, cytotoxicity and invasion capacities (Table 2). This revealed significant differences between RF122 and N305 strains in terms of virulent factors such as staphylococcal toxin genes. *S. aureus* RF122 carries many enterotoxin gene (including the bovine-associated variant of staphylococcal enterotoxin C carried by SaPIbov1; (Herron-Olson et al., 2007) as well as *lukM/F'* gene respectively involved in immune response disturbance and cytotoxicity against polynuclear neutrophile mainly described during strong inflammatory reaction in mammary gland. In contrast, few enterotoxin genes were found in the N305 genome except a cluster of superantigen-like proteins (set) found in one of the SaPIs predicted by PIPS analysis (Table 2). Although N305 possesses the *lukF'* gene, it does not carry the *lukM* gene, whose product combines with *lukF'* product to LukM/F', a potent toxin reportedly involved in cytotoxicity

during gangrenous mastitis. Regarding hemolysin, gene contents were similar in the two genomes (presence of *hla*, *hly*, *hld*, *hlg*). The virulence gene composition revealed the absence of TSST-1 (*tst*) and exfoliative B (*etb*) genes in the N305 genome, which can be correlated to the absence of SaPIbov1, a pathogenicity island that carries these two genes in RF122 (Herron-Olson et al., 2007). This difference in terms of toxin gene content can indeed be correlated to the differences in Mobile Genetic Elements content in the two genomes. Regarding the genes involved in biofilm formation, the genomic analyses revealed that N305 possesses all the entire *ica* operon and the *bap* locus. In contrast, the *bap* locus is absent in RF122 genome. We paid particular attention to the presence of the genes encoding surface proteins, notably the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs). A focus on MSCRAMMs genes revealed that their number is significantly higher in N305 than in RF122. N305 strain possesses two genes coding for fibronectin-binding protein (*fnbA* and *fnbB*) whereas RF122 contains only one (*fnbA*) (Figure 1). Furthermore, the *fnbA* sequence in N305 has two additional fibronectin-binding domains compared to that of RF122, which could provide N305 with a higher fibronectin affinity. Other genes coding for surface proteins, like *sasG* and *pls*, which are key elements in the colonization of the host cells (Corrigan et al., 2007; Geoghegan et al., 2010; Hussain et al., 2009), were found to be present in N305 and absent in the RF122 genome.

Same biofilm formation and cytotoxicity capacities but higher invasion rate for Newbould 305 during *in vitro* assays

Based on the differences in gene content revealed by the sequence analysis, one could expect phenotypic differences in terms of biofilm formation, cytotoxicity and invasion capacities. These three properties were tested *in vitro* at the phenotype level (see materials and methods for details). Despite clear differences in terms of content for toxin genes and genes involved in biofilm formation, the two strains did not show significant phenotypic differences. Indeed, RF122 and N305 showed the same ability to form biofilm on abiotic surface as determined by Crystal violet staining onto plastic surface (data not shown). Furthermore, the two strains showed the same cytotoxicity levels on MAC-T cells after co-incubation with their respective culture supernatant (data not shown). In contrast, regarding invasion capacity, which includes bacterial adhesion and internalization, an *in vitro* assay on MAC-T cells revealed significant differences between RF122 and N305. Indeed, the average adhesion ability of RF122 was 1.10^5 CFU/mL whereas that of N305 reached 1.10^6 CFU/mL ($p < 0.001$). For average

internalization ability, RF122 reached 2.10^5 CFU/mL whereas Newbould 305 reached $2,8.10^6$ CFU/mL ($p < 0.0005$) (Figure 2).

Comprehensive analysis of *S. aureus* Newbould 305 proteomes.

A comprehensive analysis of N305 proteomes (total cell, surface and secreted proteins) was carried out on cultures grown in conditions mimicking the mastitis context, as described previously (Le et al., 2009). N305 proteomes were compared to those of RF122. Total lysate proteins and secreted proteins were resolved by 2D-PAGE and the proteins that were found differentially produced (see materials and methods for selection criteria and details) were identified using NanoLC-MS/MS (Figure 3). Surface exposed proteins were identified by trypsin shaving followed by gel free NanoLC-MS/MS. Three biological replicates were used to achieve these analyses.

In this study a total of 216 proteins were categorized as differentially produced in N305 or RF122 and further identified. Sixty seven proteins (31 %) were identified as significantly overexpressed by RF122 and 149 (69 %) by N305. In more details, in culture supernatant, a total of 35 proteins (16.2 % of total proteins) were identified (Supplementary Table S1, 28.6 % overexpressed in RF122 and 71.4 % in N305). In total lysate, 35 proteins (16,2 % of total proteins) were identified (Supplementary Table S2, 28,6 % overexpressed in RF122 and 71,4 % in N305). The trypsin shaving enabled identifying 146 proteins (63 % of total proteins)(Supplementary Table S3, with 32,2 % overexpressed in RF122 and 67,8 % in N305).

The secretome and shaving samples contained more cytoplasmic proteins in N305 than in RF122, suggesting that N305 presents an autolytic activity higher than that of RF122. However, growth of both strains in conditions similar to those used for protein sample preparation did not show any significant differences in terms of growth rate, final biomass and survival (up to 48 hours; data not shown). Presence of cytoplasmic proteins in surface exposed and secreted protein samples is thus likely to result from leaking or slight lysis of an N305 subpopulation during growth.

Proteins were classified into COG according to their annotation. Most of the secreted and surface exposed proteins identified here belonged to cellular processes and signalling categories and poorly characterized proteins. Among these proteins, a number of exoproteases are found common to both strains (tables S1 and S3, supplemental data) and some exoproteases, like the Spl proteases, are also specifically found in N305. Virulence factors

(classified in the category of poorly characterized proteins) were also found specific to N305. These include hemolysins and leukotoxins (alpha- and gamma-hemolysins, LukS/F') and proteins involved in adhesion to host tissues (e.g. Newbould305_1324, encoding an extracellular matrix and plasma binding protein) and in the evasion to host immune response (e.g. Spa, the Immunoglobulin G binding protein A; vWbp, with high homology to a bovine variant of vonWillbrand factor binding protein with a coagulase activity). As expected total proteins (as well as surface exposed proteins) comprise many more proteins that grouped in Metabolism categories.

Discussion

S. aureus mastitis outcomes are highly variable and depend, in part, on strain-dependent features (Le Maréchal et al., 2011a). By contrast with mastitis induced by other pathogens, one of the most problematic traits of *S. aureus* mastitis is its low cure rate and its propensity to chronicity (Barkema et al., 2006 ; Barlow J., 2011) . Here, we finely characterized Newbould 305, an *S. aureus* strain that reproducibly induces mild and chronic mastitis in an experimental cow model and compared it to RF122, a well-documented *S. aureus* strain and representative of a common bovine mastitis-causing clone (Herron-Olson et al., 2007 ; Prasad and Newbould, 1968). Complementary approaches were used to gain insight in the molecular basis of *S. aureus* virulence variability in mastitis. These two strains belong to distinct sequence types (ST115 for N305 and ST151 for RF122) with N305 clustering in a group that includes several other bovine strains and strains from human or non-specified origin (Ben Zakour et al., 2008). Comparison of their genome sequences however showed strong similarities with a core genome (set of genes common to N305 and RF122) that comprises over 91 % of their gene content (Table 1). Despite this strong similarity, genomic differences were found in pseudogenes content. RF122 genome reportedly contains 70 pseudogenes (Herron-Olson et al., 2007) whereas only 6 pseudogenes are predicted in N305 genomes: *splC* (serine protease), CDSs Newbould305_0382 (encoding a bleomycin resistance protein), *lip* (encoding a triacylglycerol lipase precursor), *plc* (Newbould305_0635), and *cbi* (cobalt transporter ATP-binding subunit) pseudogenes result from a frameshift and *geh* (glycerol ester hydrolase) pseudogene result from an internal stop codon. Differences were also found in genes encoding toxins and surface proteins involved in host invasion. These genomic features were confirmed by phenotypic and proteomic characterization. Taken together, the combined results suggest that differences in surface protein belonging to the MRSCRAMMs family (Table 2) contribute to the differences observed in mastitis severity induced by these two strains.

Inventory of mastitis-associated functions in Newbould 305 reflects host adaptation and propensity to chronic mastitis.

Comparing N305 genome with that of RF122 revealed significant differences in genes encoding surface exposed and secreted proteins. A series of 4 serine proteases including SplE, D, and F, encoded by the *spl* operon, were found in N305 supernatant (Table 3). The complete *spl* operon (*splA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*; although *splC* is pseudogenized) is found in N305

whereas only splC, E, and F are found annotated in RF122 genome sequence and none of them were detected in RF122 proteome analysis. SplB and SplC were shown to degrade casein (Reed et al., 2001), which might help the strains to grow in this environment. Other differences were found in toxin genes content, which correlates with differences in MGE composition. RF122, associated to severe mastitis, is well-equipped in genes encoding enterotoxins, hemolysins, exfoliatin, toxic shock syndrome toxin, and leukocidin whereas N305 genome carries fewer and different toxin genes. The *lukM* gene whose product combines with LukF' to form the potent LukM/F' leucotoxin, is missing in N305 whereas RF122 possesses the complete *lukM/F'*. N305 possesses the *lukS/F'* genes and LukS and LukF' subunits were found in N305 protein samples (Table 3). LukS can oligomerize with LukF' for form a leukocidin toxin as well. However, Luk M/F' leucotoxin, found in RF122, was shown to be associated with severe clinical mastitis and to be highly prevalent in gangrenous mastitis isolates (Rainard et al., 2003; Rainard, 2007). Other toxin genes are absent in N305 genome, as compared to RF122 genome and this could explain its less virulent phenotype. Genes encoding toxic shock syndrome toxin, exfoliatin B and enterotoxins like *sec*, carried by SaPI_{bov}, and *seg*, *sei*, *sen*, *seo*, carried by an enterotoxin gene cluster (*egc*), are indeed present in RF122 and absent in N305 genome. Enterotoxins play a major role during staphylococcal infections and can induce a high immune response in the mammary gland (Haenni et al., 2011). Some of these differences in gene content were confirmed by the proteomic analysis of RF122 and N305 culture supernatants. However, despite significant genomic and proteomic differences, cytotoxicity of RF122 and N305 were comparable as shown in an in vitro MTT assay on MAC-T cells, in the conditions used here. This discrepancy between genomic and proteomic contents and the expected cytotoxicity phenotype underlines the importance of *in vivo* validation of *in silico* and proteomic predictions. *S. aureus* virulence is obviously associated to its gene content, but also to the capacity to express this genetic equipment in a specific context. The differences observed here advocate for a higher virulence in the mastitis reference strain RF122. However, this does not fully explain yet the milder and chronic symptoms observed in N305 induced mastitis.

Interestingly, one of the N305 SaPIs predicted by PIPS analysis and absent in RF122 genome shares homology to SaPI_{bov5} recently described (Viana et al., 2011). This SaPI carries a CDS, Newbould305_0962 (automatically annotated Uncharacterized protein), which shares homology with SaPI_{bov4}_ORF15, a gene encoding a bovine and SaPI-associated variant of vonWillbrand factor binding protein described in *Staphylococcus aureus* strain BA4

pathogenicity island SaPIbov4 (Viana et al., 2010). Newbould305_0962 product was also found in N305 surface exposed protein (Table S3).

These bovine variants of Wbp, identified in SaPIbov4, and SaPIbov5 were shown to provide the carrier-*S. aureus* strains with the ability to specifically coagulate ruminant plasma (as shown with ovine plasma), whereas strains that do not carry these SaPIs (like RF122) coagulate rabbit plasma (usually used to assay coagulation capacities) but not ruminant ones (Viana et al., 2011). Whether the vWbp produced and exported by N305 is active on ruminant plasma remains to be shown. This observation however shows that N305 possesses species-specific coagulation capacities and might thus be well-adapted to its bovine host.

***S. aureus* Newbould 305 is well-armed to invade host cells.**

The genomic comparison of *S. aureus* N305 (Bouchard et al., 2012) and RF122 also revealed differences in colonization and invasion factors. Most of these factors belong to surface proteins called Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules (SERAMs) or Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs), which participate in adhesion but also in internalization of *S. aureus* into host cells (Heilmann, 2011). Secreted adhesins proteins, like SERAMs, or covalently-linked adhesins protein, like MSCRAMMs, interact with host proteins such as fibronectin, collagen and elastin and trigger invasion. Numerous studies report the importance of these factors during the infection. Especially, fibronectin-binding proteins are considered the major staphylococcal protein involved in *S. aureus* internalization into host cells (Fraunholz and Sinha, 2012).

Focusing genome comparison of RF122 and N305 on the surface proteins revealed that N305 is better equipped than RF122 for host invasion. *S. aureus* N305 indeed possesses two fibronectin-binding proteins (*fnbA* and *fnbB*) instead of one for RF122 (*fnbA*). Furthermore, the comparison of the predicted FnbA protein sequence revealed that N305 FnbA presents two additional fibronectin-binding domains compared to the RF122 one. This suggests a higher affinity of N305 for fibronectin, as fibronectin-binding proteins were shown to be indispensable for *S. aureus* internalization into host cells (Edwards et al., 2011a and 2011b ; Fraunholz and Sinha, 2012. Other surface protein genes were found missing in RF122 genome and present in N305. These include *sasG* and *pls* genes, known to participate to host colonization and to modulate pathogens internalization. These *in silico* observations were confirmed through phenotypic characterization of adhesion and internalization capacities of both strains, tested *in vitro* on bovine MEC culture (MAC-T line). Adhesion and

internalization rates of N305 were indeed significantly higher than those of RF122. These capacities seem to favor *S. aureus* N305 host invasion and, together with the lower number of toxin genes and host-adaptation feature like the production of vWbp, could be an explanation for a lesser virulent, but chronic phenotype of *S. aureus* N305.

Conclusions

The current study provides an in-depth comparison of gene content, proteome and phenotypic capacities (cytotoxicity assay, biofilm formation and cell invasion) of N305, an *S. aureus* strain that reproducibly induced chronic mastitis in cows. These features were compared to that of RF122, a well-characterized strain, representative of the major clone involved in bovine mastitis. The results revealed that several systems could contribute to mastitis severity, including MGEs, toxins production and surface proteins. These findings indicate that N305 harbors lesser toxin genes but more colonization and invasion factors than RF122, a more virulent mastitis strain. *In vitro*, only adhesion and internalization were significantly different between the two strains. Understanding *S. aureus* invasive mechanism represents a necessary step towards the development of strategies to prevent and combat infections. Although, no significant differences were observed in cytotoxicity or in biofilm formation despite clear differences in terms of toxin or biofilm associated genes, further experiments will be necessary to identify the ability of each strain to express its virulent factors *in situ*.

Table 1. General features of Newbould 305 and comparison to RF122 genome.

	Newbould305	RF122
Size	2,791,699 bp	2,742,531
GC %	32.8	32.8
Number of CDS's	2,752	2,664
Number of SNPS	48,371	
CORE NB x RF122	2,518 (e-value = 10^{-5} /identity>70%)	
pseudogene	6	76
Protein coding genes with COGs	2,052 (70.53%)	1,903 (70.74%)
rRNA genes	5S rRNA = 7 16S rRNA = 6 23S rRNA = 7	5S rRNA = 6 16S rRNA = 5 23S rRNA = 5
tRNA genes	56	64

Table 2: Presence (+) or absence (-) of virulence-associated genes in RF122 and N305.

Gene name			
Biofilm formation	Function	RF122	N305
<i>ica</i> operon	Biofilm synthesis <i>ica</i> operon	+	+
<i>bap</i>	Biofilm associated protein	-	+
<i>ypfP</i> , <i>ltaA</i> , <i>S</i> , <i>tag</i> and <i>dlt</i> operons	Teichoic and Lipoteichoic acid synthesis	+	+
<i>cap</i> operon	Capsular polysaccharide biosynthesis	+	+
Secreted toxins	Function	RF122	N305
<i>lukE</i>	Leukocidin LukE precursor	+	+
<i>lukD</i>	Leukocidin LukD precursor	+	+
<i>lukS</i>	Leukocidin/hemolysin toxin subunit S	-	+
<i>lukM</i>	Leukocidin chain lukM precursor	+	-
<i>lukF-PV</i>	Panton-Valentine leukocidin LukF-PV chain	+	+
<i>hla</i>	Alpha-hemolysin precursor	+	+
<i>hly</i>	Beta-hemolysin precursor	+	+
<i>hlg</i> (subunits A, B, C)	Gamma-hemolysin component	+	+
<i>hld</i>	Delta-hemolysin	+	+
<i>atl</i>	Bifunctional autolysin precursor	+	+
<i>tst</i>	Toxic shock syndrome toxin 1	+	-
<i>eta</i>	Exfoliative A	+	+
<i>etb</i>	Exfoliative B	+	-
<i>sea</i>	Staphylococcal enterotoxin A	+	+
<i>sec bov</i>	Bovine variant of Staphylococcal enterotoxin C	+	-
<i>seg</i>	Staphylococcal enterotoxin G	+	-
<i>sei</i>	Staphylococcal enterotoxin I	+	-
<i>sel</i>	Staphylococcal enterotoxin L	+	-
<i>sen</i>	Staphylococcal enterotoxin N	+	-
<i>seo</i>	Staphylococcal enterotoxin O	+	-
Colonisation factors	Function	RF122	N305
<i>vwb</i>	Secreted von Willebrand factor-binding protein (Wbp) precursor	+	+
<i>vwb^{Sbo5}</i>	SaPI-encoded variant of Wbp carried by SaPI _{bov5}	-	+
<i>clfA</i>	Clumping factor A	+	+
<i>clfB</i>	Clumping factor A	+	+
<i>fnbA</i>	Fibronectin binding protein A	+	+
<i>fnbB</i>	Fibronectin binding protein B	-	+
<i>stl</i>	Transcriptional Repressor SaPI	+	+
<i>eap</i>	Extracellular adherence protein	+	+
<i>sasG</i>	<i>S. aureus</i> surface protein G	-	+
<i>plsC</i>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	-	+
<i>sak</i>	Staphylokinase	-	-
<i>spa</i>	Immunoglobulin G binding protein A precursor	+	+

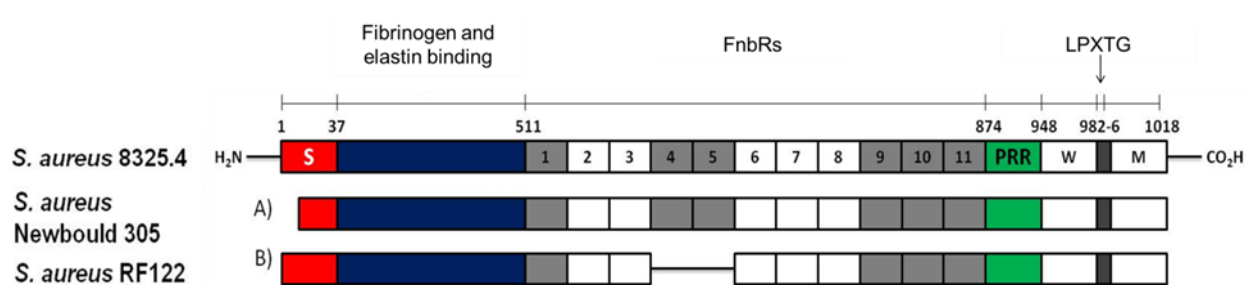


Figure 1 : *S. aureus* Fnba in protein structure comparison. Fnba in *S. aureus* 8325.4 (SWISS-Prot P14738) contains 11 Fn-binding sites. Fnba from *S. aureus* Newbould 305 (A) and RF122 (B) showing the approximate position of the predicted FnRs. High-affinity FnRs are shaded. Also shown signal peptide (S), proline-rich repeats (PRR), cell wall-spanning sequence (W), membrane-spanning region (M).

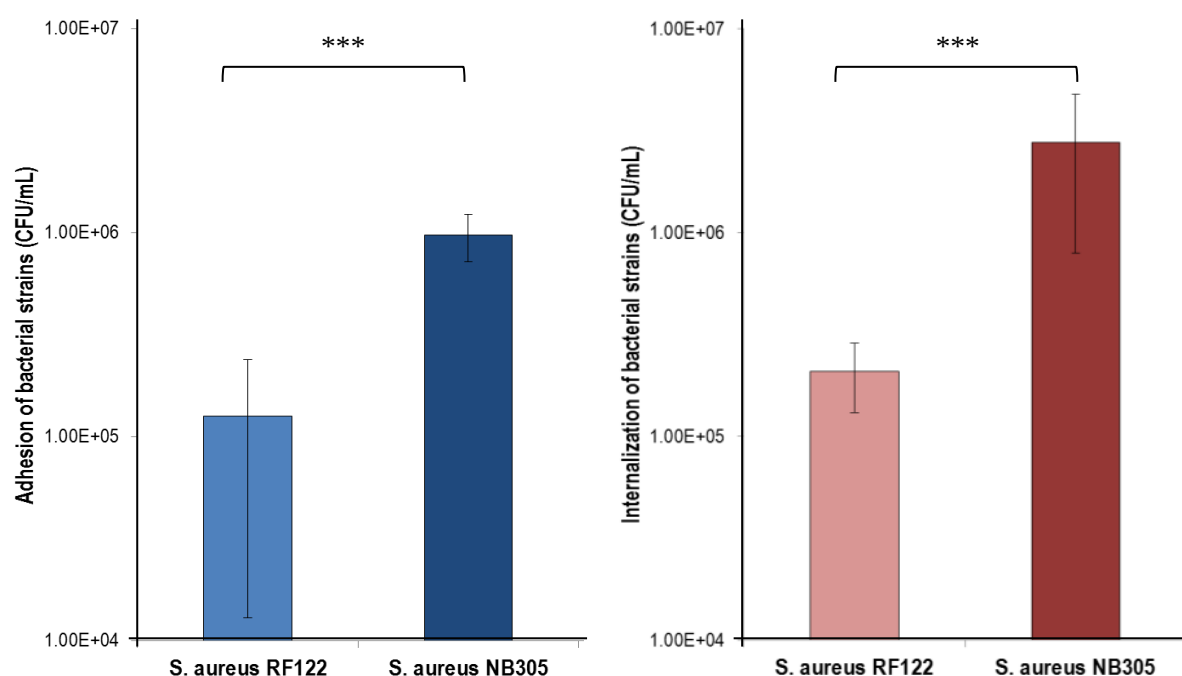


Figure 2 : Adhesion to and internalization into bMECof *S. aureus* strains RF122 and N305 (MOI of 100:1). Populations adhered to (A) and internalized into (B) bMEC were determined after 1 and 2 h of interaction, respectively. Data are presented as mean populations per well (i.e., corresponding to 2.5×10^5 bMEC) $\pm$ standard deviations. Each experiment was done in triplicate, and differences between groups were compared using Student's t test. *** P < 0.0005.

Table 3: Compilation of proteins identified with the different methods used.

Description ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ	Strain ^j		Method ^k		
									RF122	N305	Exo.	Tot.	Shav.
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING													
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning													
Probable transglycosylase IsaA	isaA	Q2YWD9	-19,11	26	28,20	4	0,833	S	X		X		X
Cell wall/membrane/envelope biogenesis													
Iron-regulated surface determinant protein B	isdB	Q2YX96	-110,18	39	72,00	25	1,219	W	X		X		
Lipoteichoic acid synthase	ltaS	Q2YSL2	-71,63	33	74,20	16	1,050	C/M	X		X		
Penicillin-binding protein 2	pbp2	Q2YY56	-19,82	14	80,20	6	0,212	C/M	X				X
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones													
Serine protease SplE	splE	J1EZ78	-10,09	10	25,60	2	0,250	C/M		X	X		
Serine protease SplF	splF	J0KV93	-56,13	72	25,60	15	1,889	S		X	X		
Serine protease SplD	splD	J0L226	-46,44	59	25,60	12	1,778	S		X	X		
Serine proteinase	Newbould305_0049	J0UNB6	-65,13	45	27,80	16	2,556	S		X	X		
Chaperone protein DnaK	dnaK	Q2YT47	-56,49	33	66,20	15	1,000	C	X			X	
Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	ahpF	Q2YVH8	-63,11	35	54,50	11	1,421	C/M	X			X	
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	ahpC	Q2YVK2	-43,00	65	20,90	9	1,800	C	X			X	
Defense mechanisms													
Alkaline shock protein 23	asp23	J0KY19	-7,51	15	18,60	2	0,400	U		X		X	
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING													
Replication, recombination and repair													
Thermonuclease	nucI	J0UHM2	-21,19	18	21,80	4	0,625	S		X			X
METABOLISM													
Inorganic ion transport and metabolism													
Superoxide dismutase	sodM	J0UM22	-18,62	38	22,90	5	0,556	S		X	X		
POORLY CHARACTERIZED													
Alpha-hemolysin	hla	J0KWK7	-81,73	70	36,20	19	1,294	S		X	X		
Gamma-hemolysin component C	hlgC	J1ET20	-61,41	46	35,50	17	1,438	S		X	X		
Superantigen-like protein	set11	J1EYV1	-20,88	28	25,70	5	0,500	S		X	X		

Superantigen-like protein 7 set5 J1EYV6 -58,90 59 26,00 14 1,462 S X X

Table 3 (continued)

Description ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ	Strain ^j			Method ^k	
									RF122	N305	Exo.	Tot.	Tryp.
Staphylococcal enterotoxin C-bovine	sec-bov	Q2YVN9	-80,55	57	31,20	20	2,000	S	X		X		
Superantigen-like protein	Newbould305_1808	J0KPN6	-21,78	18	27,70	3	0,444	S		X			X
Gamma-hemolysin component A	hlgA	J0KNX1	-9,58	17	36,30	3	0,231	S		X			X
Leukocidin S subunit	Newbould305_2380	J0KP92	-109,17	46	40,20	18	1,882	S		X			X
Leukocidin F subunit	Newbould305_2381	J1ET76	-84,54	38	38,60	11	1,267	S		X			X
Superantigen-like protein	set19	J0UMW3	-9,75	20	39,80	4	0,353	S		X			X
Extracellular matrix and plasma binding protein	Newbould305_1324	J0UKH8	-60,09	31	38,30	13	1,450	W		X			X
Immunoglobulin G binding protein A (Protein A)	spa	J1EXZ6	-184,02	43	56,80	20	2,160	W		X			X
Panton-Valentine leukocidin LukF-PV chain	SAB0783	Q2YWM7	-34,02	36	36,40	8	0,769	S		X			X
Leukocidin chain lukM	SAB0782	Q2YWM8	-35,33	29	35,00	7	0,588	S	X				X
Iron-regulated protein	isdD	Q2YX93	-8,81	10	41,20	3	0,200	U	X				X
Leukotoxin E subunit	lukE	Q2YTQ3	-20,97	20	34,60	5	0,333	S	X				X
Elastin-binding protein EbpS	ebpS	Q2YY76	-27,20	10	52,90	5	0,400	C/M	X				X
Molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	hchA	J1EVT7	-32,69	38	32,00	8	1,364	C		X		X	

^a : Proteins are classified in COG. Names are given according to annotation of genome sequences

^b : Correspond to the commonly found name of the gene

^c : Accessions numbers are given according to references on UniProtKB (<http://www.uniprot.org>)

^d : Probability of critical error in the protein identification given by the X!Tandem software

^e : % of the protein covered with the identified peptides

^f : Theoretical mass as predicted from the protein sequence

^g : Number of identified peptides

^h : Protein abundance index

ⁱ : Predicted localisation based on PSORTb software. S=Extracellular C=Cytoplasmic C/M=Cytoplasmic/Membrane W=Cell wall U=Unknown

^j : Strain in which the protein was identified

^k : Method used to identify the protein Exo.=Proteins identified in supernatant Tot.=Proteins identified in total lysate Shav.=Proteins identified by trypsin shaving

Supplemental data.**Table S1: Proteins identified as differentially secreted by *S. aureus* RF122 and N305.**

Description ^a RF122	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning											
Probable transglycosylase IsaA	22	4,99E-06	2,1	isaA	Q2YWD9	-19,11	26	28,20	4	0,83	S
Cell wall/membrane/envelope biogenesis											
Iron-regulated surface determinant protein B	1, 2, 3, 4, 5, 6	3,93E-05	2,4	isdB	Q2YX96	-110,18	39	72,00	25	1,22	W
Lipoteichoic acid synthase	7	4,53E-04	2,1	ltaS	Q2YSL2	-71,63	33	74,20	16	1,05	C/M
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	14, 16	7,29E-05	2,4	SAB2519	Q2YZ57	-45,94	21	69,20	11	0,62	S
METABOLISM											
Nucleotide transport and metabolism											
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	19	1,05E-05	2,2	guaB	Q2YVL6	-22,08	13	52,70	5	0,20	C
Inorganic ion transport and metabolism											
Probable zinc-binding lipoprotein	8	2,79E-04	2	SAB2286c	Q2YW05	-15,12	14	59,00	6	0,35	C/M
Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism											
D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	18	4,14E-04	2,6	dltA	Q2YWQ8	-14,13	10	54,50	3	0,18	C
POORLY CHARACTERIZED											
Glycerol ester hydrolase	1, 2	9,76E-05	2,4	geh	Q2YVD0	-42,68	22	72,20	9	0,42	S
Staphylococcal enterotoxin C-bovine	9, 10, 11, 12, 13	1,08E-06	3,8	sec-bov	Q2YVN9	-80,55	57	31,20	20	2,00	S
Probable exported protein	17, 18	4,14E-04	2,6	SAB0387	Q2YVR3	-15,00	8	56,30	4	0,19	U
Description ^a N305	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones											
Foldase protein PrsA	40	4,21E-07	6,6	prsA	J0L203	-56,29	34	35,50	15	1,07	C/M
Coenzyme A disulfide reductase	29	2,21E-03	2	cdr	J1EWL3	-62,67	44	49,20	14	0,63	C
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	32, 34, 35, 36, 51, 52	1,28E-04	2	ahpC	J1EYK8	-19,09	27	20,90	3	0,30	C
Serine protease SplE	47, 48, 49	2,57E-04	3,3	splE	J1EZ78	-10,09	10	25,60	2	0,25	C/M
Serine protease SplF	48, 49	2,57E-04	3,3	splF	J0KV93	-56,13	72	25,60	15	1,89	S
Serine protease SplD	48	2,57E-04	3,3	splD	J0L226	-46,44	59	25,60	12	1,78	S
Serine proteinase	47	1,07E-04	3,2	Newbould305_0049	J0UNB6	-65,13	45	27,80	16	2,56	S
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING											

Translation, ribosomal structure and biogenesis

Elongation factor Ts	36, 37, 42	1,51E-05	2	tsf	J0KWZ6	-91,77	68	32,40	21	1,56	C

METABOLISM**Energy production and conversion**

Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	32	7,32E-04	2,4	pdhA	J0KP28	-8,58	7	41,30	2	0,15	C

Table S1 (continued)

Description ^a N305	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
L-lactate dehydrogenase	50, 51, 52	2,44E-04	2,4	ldh	J1EXA2	-31,90	22	34,30	6	0,54	C
Amino acid transport and metabolism											
Xaa-Pro dipeptidase-like protein	32	7,32E-04	2,4	Newbould305_0180	J0UNM4	-9,93	9	39,50	3	0,30	C
Thimet oligopeptidase	25	1,53E-03	2,4	pepB	J1EWN7	-46,18	23	69,70	12	0,60	C
Carbohydrate transport and metabolism											
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	32, 34, 35, 36	4,15E-06	4,1	gap	J0KSH5	-17,63	22	36,20	5	0,46	C
Glucose-6-phosphate isomerase	30	2,18E-05	2,7	pgi	J0UKP5	-101,03	55	49,70	22	2,06	C
2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	43, 44	6,54E-05	2,8	gpmA	J1ET24	-67,89	64	26,60	15	1,42	U
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	32	7,32E-04	2,4	Newbould305_1539	J1EUY4	-40,81	35	44,80	12	0,75	C
Phosphoglycerate kinase	32, 33	7,32E-04	2,4	pgk	J1EWC9	-86,90	55	42,50	19	1,11	C
Enolase	28, 31	3,75E-04	2,3	eno	J1EWJ2	-104,19	57	47,00	20	1,15	C
Fructose-bisphosphate aldolase class 1	43	6,54E-05	2,8	fda	J1EXA7	-83,88	65	32,90	18	1,80	U
Lipid transport and metabolism											
3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase	34	4,15E-06	4,1	mvaS	J1EX99	-26,02	30	40,90	9	0,60	C
Inorganic ion transport and metabolism											
Superoxide dismutase	51, 52	2,44E-04	2,4	sodM	J0UM22	-18,62	38	22,90	5	0,56	S
POORLY CHARACTERIZED											
Alpha-hemolysin	39, 40, 41, 47	4,21E-07	6,6	hla	J0KWK7	-81,73	70	36,20	19	1,29	S
Gamma-hemolysin component C	40	4,21E-07	6,6	hlgC	J1ET20	-61,41	46	35,50	17	1,44	S
Superantigen-like protein	48	1,07E-04	3,2	set11	J1EYV1	-20,88	28	25,70	5	0,50	S
Superantigen-like protein 7	46	1,32E-05	3,2	set5	J1EYV6	-58,90	59	26,00	14	1,46	S

^a : Proteins of each strain are classified in COG. Names are given according to annotation of genome sequences^b : Spot numbers^c : The ANOVA p-value indicates the degree of confidence of each fold change, determined by the SameSpot software on 3 biological replicates and 3 technical replicates^d : The fold change is the rate of overexpression in one of the strains, determined by the SameSpot software^e : Correspond to the commonly found name of the gene^f : Accessions numbers are given according to references on UniProtKB (<http://www.uniprot.org>)

D. Bouchard, 2013

Chap II. Comparaison des souches de *S. aureus*

^g : Probability of critical error in the protein identification given by the X!Tandem software

^h : % of the protein covered with the identified peptides

ⁱ : Theoretical mass as predicted from the protein sequence

^j : Number of identified peptides

^k : Protein abundance index

^l : Predicted localisation based on PSORTb software. S=Extracellular C=Cytoplasmic C/M=Cytoplasmic/Membrane W=Cell wall U=Unknown

Table S2 :Proteins identified as differentially expressed in the total lysate by *S. aureus* RF122 and N305.

Description ^a RF122	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones											
Chaperone protein DnaK	57, 62, 63, 64, 65	6,30E-06	4,3	dnaK	Q2YT47	-56,49	33	66,20	15	1,00	C
Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	57, 58, 59	5,01E-05	4,6	ahpF	Q2YVH8	-63,11	35	54,50	11	1,42	C/M
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	56	7,40E-04	2,5	ahpC	Q2YVK2	-43,00	65	20,90	9	1,80	C
Probable protease (Zinc) protein	53	3,76E-05	2	SAB1141	Q2YXN7	-7,79	5	49,90	2	0,13	U
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING											
Translation, ribosomal structure and biogenesis											
Elongation factor Ts	55	8,29E-04	3,7	tsf	Q2YXL1	-26,13	23	32,30	5	0,39	C
METABOLISM											
Energy production and conversion											
Phosphotransacetylase	56	7,40E-04	2,5	pta	Q2YS76	-43,29	42	34,90	9	0,83	U
ATP synthase subunit beta	53	3,76E-05	2	atpD	Q2YUK1	-115,92	56	51,30	21	1,33	C/M
Carbohydrate transport and metabolism											
Enolase	53	3,76E-05	2	eno	Q2YSE8	-86,66	52	47,00	15	1,20	C
Fructose-disphosphate aldolase class 1	60, 61	4,33E-04	6,3	fda	Q2YWF3	-58,15	55	32,80	13	1,40	U
Coenzyme transport and metabolism											
Coenzyme A disulfide reductase	54	2,19E-09	16	cdr	Q2YWW1	-67,61	29	49,20	8	0,42	C
Description ^a N305	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones											
Thioredoxin reductase	85	6,52E-07	2,4	trxB	J1EWC4	-45,94	42	33,50	11	1,10	C
Protein GrpE	88	9,35E-08	2,8	grpE	J0KVVU6	-7,36	13	23,90	2	0,25	C
Trigger factor	86	6,05E-05	4,4	tig	J0KVL9	-32,61	16	48,40	5	0,46	C
Defense mechanisms											
Alkaline shock protein 23	98	3,80E-04	9,8	asp23	J0KY19	-7,51	15	18,60	2	0,40	U
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING											
Translation, ribosomal structure and biogenesis											
Translation initiation factor IF-2	66	9,03E-04	2	infB	J1ETX7	-18,74	6	77,70	3	0,10	C

Elongation factor Tu

87, 93 1,92E-05 3 tuf J1EVM7 -21,55 12 43,00 3 0,35 C

Table S2 (continued)

Description ^a N305	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
Replication, recombination and repair											
DNA polymerase III subunit beta	81	5,46E-05	3,4	dnaN	J1EXP8	-10,55	8	41,80	2	0,10	C
METABOLISM											
Energy production and conversion											
L-lactate dehydrogenase	83	1,50E-04	4	ldh	J1EXA2	-68,53	49	34,30	11	1,38	C
Phosphotransacetylase	81	5,46E-05	3,4	eutD	J0UJS8	-49,54	45	34,80	10	0,92	C
L-lactate dehydrogenase	74, 84	8,36E-07	5,7	ldh	J0UMC4	-64,29	42	34,50	21	1,75	C
Amino acid transport and metabolism											
Ornithine cyclodeaminase protein	77	5,41E-04	4,1	Newbould305_0656	J0KU07	-5,02	8	37,70	2	0,17	C
Branched-chain-amino-acid aminotransferase	76	6,62E-04	3,4	Newbould305_1079	J0UJN7	-51,83	47	40,00	10	0,78	U
Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	67	1,99E-02	3,7	pdhC	J0KW19	-13,81	11	46,40	2	0,13	C
D-alanine aminotransferase	89, 91	3,62E-05	2,6	dat	J1EZD0	-40,52	41	31,70	8	0,59	C
Proline dipeptidase	78, 80	8,49E-07	8,2	Newbould305_2310	J0UJ09	-19,86	20	39,20	5	0,50	C
Oligoendopeptidase F	66	9,03E-04	2	Newbould305_2157	J1EUN3	-29,36	12	69,10	5	0,24	C
Ornithine carbamoyltransferase	78	8,49E-07	8,2	arcB	J0ULD6	-76,37	48	37,70	14	1,36	C
Carbohydrate transport and metabolism											
Triosephosphate isomerase	94	6,99E-04	2,9	tpiA	J0UKG7	-20,62	24	27,20	4	0,29	C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	89	1,00E-03	4,7	gap	J0KSH5	-14,29	8	36,20	2	0,31	C
Phosphoglycerate kinase	79	4,35E-05	4,4	pgk	J1EWC9	-63,97	44	42,50	11	0,67	C
Transketolase	67, 89	1,00E-03	4,7	Newbould305_2114	J1EUC2	-84,78	35	72,10	16	0,69	U
Putative transaldolase	97	1,98E-04	2,5	Newbould305_0104	J1EZA8	-24,29	36	25,60	6	0,58	C
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	71	3,51E-05	3,1	gnd	J0UIZ1	-20,99	10	51,70	4	0,26	C
Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism											
Acetoin reductase	95	1,07E-04	4,1	Newbould305_0667	J1EXV9	-10,20	16	27,10	3	0,38	C
POORLY CHARACTERIZED											
UPF0447 protein Newbould305_1113	96	1,07E-04	2,2	Newbould305_1113	J1EVS0	-16,53	21	29,30	4	0,56	U

Molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	89, 90, 91	3,62E-05	2,6	hchA	J1EVT7	-32,69	38	32,00	8	1,36	C

^a : Proteins of each strain are classified in COG. Names are given according to annotation of genome sequences

^b : Spot numbers

^c : The ANOVA p-value indicates the degree of confidence of each fold change, determined by the SameSpot software on 3 biological replicates and 3 technical replicates

^d : The fold change is the rate of overexpression in one of the strains, determined by the SameSpot software

^e : Correspond to the commonly found name of the gene

^f : Accessions numbers are given according to references on UniProtKB (<http://www.uniprot.org>)

^g : Probability of critical error in the protein identification given by the X!Tandem software

^h : % of the protein covered with the identified peptides

ⁱ : Theoretical mass as predicted from the protein sequence

^j : Number of identified peptides

^k : Protein abundance index

^l : Predicted localisation based on PSORTb software. S=Extracellular C=Cytoplasmic C/M=Cytoplasmic/Membrane W=Cell wall U=Unknown

Table S3 : Proteins identified with the trypsin shaving method.

Description ^a RF122	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING								
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning								
Probable transglycosylase IsaA	isaA	Q2YWD9	-64,45	47	24,20	10	4,25	S
Cell wall/membrane/envelope biogenesis								
Probable exported protein	SAB2519	Q2YZ57	-23,92	10	69,20	4	0,29	S
Penicillin-binding protein 2	pbp2	Q2YY56	-19,82	14	80,20	6	0,21	C/M
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sle1	sle1	Q2YVT4	-14,69	16	35,80	4	0,38	W
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones								
Probable thioredoxin	SAB0762c	Q2YWM3	-5,84	24	12,00	2	0,40	C
Probable serine protease	SAB1586	Q2YTG2	-14,24	16	45,60	4	0,24	C/M
Signal transduction mechanisms								
S-ribosylhomocysteine lyase	luxS	Q2YUL9	-5,47	17	17,50	2	0,60	C
Serine-protein kinase RsbW	rsbW	Q2YUI8	-5,87	13	17,80	2	0,20	C
Histidine protein kinase SaeS	saeS	Q2YSM6	-6,86	9	39,60	2	0,25	C/M
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport								
Type-I signal peptidase	spsB	Q2YWR9	-18,30	28	21,60	5	0,46	W
Defense mechanisms								
Lipid II:glycine glycytransferase	femX	Q2YYN5	-20,68	8	48,40	3	0,19	C
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING								
Translation, ribosomal structure and biogenesis								
30S ribosomal protein S6	rpsF	Q2YVJ2	-10,10	52	11,50	5	0,86	C
50S ribosomal protein L28	rpmB	Q2YXJ2	-4,47	23	6,90	2	1,00	C
50S ribosomal protein L18	rplR	Q2YYL3	-11,99	33	13,00	4	1,00	C
30S ribosomal protein S18	rpsR	Q2YVJ0	-15,52	32	9,20	4	2,00	C
50S ribosomal protein L17	rplQ	Q2YYM3	-15,45	22	13,70	2	0,75	C
50S ribosomal protein L30	rpmD	Q2YYL5	-11,70	36	6,50	2	0,50	C
Translation initiation factor IF-3	infC	Q2YTA9	-5,42	10	20,10	2	0,29	C
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	pheS	Q2YX87	-11,97	8	40,00	2	0,17	C
Transcription								
Probable exported protein	SAB0922c	Q2YX19	-18,61	26	46,00	5	0,38	C/M
Putative uncharacterized protein	SAB0063	Q2YUV7	-30,92	29	29,50	6	0,41	C
Transcription termination/antitermination protein nusG	nusG	Q2YSC5	-6,97	13	20,60	2	0,18	C
Replication, recombination and repair								
DNA ligase	ligA	Q2YU70	-4,23	4	74,90	2	0,05	C

METABOLISM**Energy production and conversion**

Probable quinol oxidase subunit 2

qoxA	Q2YX14	-20,62	20	41,70	6	0,58	C/M

Table S3 (continued)

Description ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	gpsA	Q2YY82	-8,60	10	36,00	3	0,25	C
Probable alcohol dehydrogenase	SAB1296c	Q2YY27	-21,82	17	35,50	4	0,54	U
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	citC	Q2YTE6	-7,09	6	46,30	2	0,13	C
Nucleotide transport and metabolism								
Deoxyribose-phosphate aldolase 1	deoC1	Q2YUU4	-9,97	12	23,40	2	0,18	C
Orotate phosphoribosyltransferase	pyrE	Q2YXG3	-8,59	21	22,00	2	0,25	C
Carbohydrate transport and metabolism								
Probable uridylyltransferase SAB2052c	SAB2052c	Q2YYH4	-8,90	7	44,80	2	0,10	C
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Pgm	Q2YSE9	-9,22	4	56,30	2	0,19	C
Probable exported protein	SAB1633c	Q2YTL2	-6,55	14	32,40	2	0,21	S
Coenzyme transport and metabolism								
Demethylmenaquinone methyltransferase	ubiE	Q2YY85	-10,47	10	27,20	2	0,17	U
Lipid transport and metabolism								
1-phosphatidylinositol phosphodiesterase	Plc	Q2YUT1	-27,62	24	36,90	6	0,89	S
Inorganic ion transport and metabolism								
Probable membrane protein	SAB1406	Q2YSZ5	-7,96	15	14,70	2	0,40	U
POORLY CHARACTERIZED								
Ser-Asp rich fibrinogen-binding/bone sialoprotein-binding protein	SAB0513	Q2YSA1	-232,64	45	120,70	33	1,06	W
Panton-Valentine leukocidin LukF-PV chain	SAB0783	Q2YWM7	-34,02	36	36,40	8	0,77	S
Leukocidin chain lukM	SAB0782	Q2YWM8	-35,33	29	35,00	7	0,59	S
Putative uncharacterized protein	SAB1759	Q2YTX0	-23,39	29	19,20	4	1,20	U
Probable lipoprotein	SAB0692	Q2YSI9	-12,07	14	34,30	4	0,25	U
Iron-regulated protein	isdD	Q2YX93	-8,81	10	41,20	3	0,20	U
Probable lipoprotein	SAB1403	Q2YSZ8	-6,23	15	21,30	2	0,25	S
Leukotoxin E subunit	lukE	Q2YTDQ3	-20,97	20	34,60	5	0,33	S
Elastin-binding protein EbpS	ebpS	Q2YY76	-27,20	10	52,90	5	0,40	C/M
UPF0342 protein SAB1778c	SAB1778c	Q2YDZ2	-27,39	53	13,20	3	0,63	C
Putative uncharacterized protein	SAB0328c	Q2YVI0	-11,50	14	23,60	3	0,33	U
Putative uncharacterized protein	SAB1052	Q2YXD4	-14,83	20	25,50	3	0,44	C

Description ^a N305	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ

CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING

Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning

Septation ring formation regulator EzrA	ezrA	J1EZG0	-50,38	18	66,10	6	0,24	C/W
Iron-sulfur cluster repair protein ScdA	scdA	J0UMD9	-8,72	17	25,40	3	0,25	C
Cell wall/membrane/envelope biogenesis								
Elongation factor 4	lepA	J1EVS2	-9,48	4	68,00	2	0,08	C/W

Table S3 (continued)

Description ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
Undecaprenyl-PP-MurNAc-pentapeptide-UDPGlcNAc GlcNAc transferase	murG	J1EUR0	-11,35	8	39,60	2	0,13	C/W
UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	murB	J0KZ95	-6,26	8	33,70	2	0,15	C
UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	murD	J0KWM8	-8,80	8	49,70	2	0,18	C
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones								
ATP-dependent protease subunit HslV	hslV	J0KWZ1	-20,34	19	19,50	3	0,63	C
Thioredoxin reductase	trxB	J1EWC4	-10,49	10	33,50	2	0,20	C
Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	msrA	J0KQP0	-19,91	24	20,50	3	0,50	U
Signal transduction mechanisms								
Universal stress protein family protein	Newbould305_0182	J1EZI3	-18,69	28	15,20	3	0,50	U
Two-component response regulator	yycF	J0L0Q9	-14,60	25	27,40	4	0,42	C
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport								
Signal recognition particle protein	Ffh	J0KPU1	-20,71	10	50,60	3	0,20	C/W
Defense mechanisms								
ABC transporter	Newbould305_0374	J1EWZ5	-5,71	9	25,70	2	0,17	C/W
ATP-binding ABC transporter protein	Newbould305_1348	J1EWF8	-9,26	8	38,10	2	0,15	C/W
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING								
Translation, ribosomal structure and biogenesis								
Pseudouridine synthase	rluB	J1EUZ6	-17,69	20	27,90	3	0,25	C
Tyrosine--tRNA ligase	tyrS	J1EZG1	-12,66	12	47,50	3	0,19	C
Isoleucine--tRNA ligase	ileS	J0KWN8	-103,54	27	104,70	18	0,59	C
Arginine--tRNA ligase	argS	J0KYW4	-20,43	8	62,20	3	0,10	C
Leucine--tRNA ligase	leuS	J0UNH6	-18,84	10	91,60	3	0,12	C
Peptide chain release factor 3	prfC	J0KSW0	-10,23	6	59,40	2	0,11	C
Peptide deformylase	Def	J0UGP6	-6,66	12	20,50	2	0,25	C
Uncharacterized protein	Newbould305_0284	J1EZR2	-45,86	72	11,00	6	2,25	C
UPF0477 protein Newbould305_1457	Newbould305_1457	J0KSV1	-22,60	27	19,20	3	0,63	C

Transcription

Rrf2 family transcriptional regulator	Newbould305_0252	J1EZQ2	-34,18	44	15,50	4	1,00	C
Redox-sensing transcriptional repressor rex	Rex	J1ET27	-11,38	15	23,50	3	0,30	C
HTH-type transcriptional regulator rot	Rot	J0L278	-21,52	26	19,30	5	1,00	U
Uncharacterized protein	Newbould305_2350	J0KP60	-10,22	11	26,00	2	0,22	C

Replication, recombinaison and repair

Transcription-repair coupling factor	Newbould305_2621	J0KVM9	-6,61	2	134,00	2	0,04	C
Thermonuclease	nucI	J0UHM2	-21,19	18	21,80	4	0,63	S
DNA gyrase subunit B	gyrB	J1EXV7	-12,87	9	72,40	4	0,14	C
Chromosomal replication initiator protein DnaA	dnaA	J0KTV1	-11,80	9	51,80	3	0,11	C
Primosomal protein DnaI	dnaI	J0UNP2	-11,74	10	35,50	2	0,13	C

Table S3 (continued)

Description ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
DNA polymerase	polA	J1EZI5	-7,59	3	99,00	2	0,05	C
METABOLISM								
Energy production and conversion								
Glycerol kinase	glpK	J0KX39	-16,25	10	55,50	4	0,17	C
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Pgm	J0KZB7	-13,30	5	56,30	2	0,13	C
Phosphotransacetylase	eutD	J0UJS8	-6,41	13	34,80	2	0,17	C
Dihydrolipoyl dehydrogenase	pdhD	J0UGP2	-11,47	9	49,30	3	0,17	C
Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily protein	Newbould305_1739	J0KRK1	-10,76	7	36,50	2	0,17	C
Amino acid transport and metabolism								
Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 2	gcvPB	J0UP14	-30,75	30	54,70	6	0,43	C
Arginine deiminase	arcA	J0L0F5	-10,33	11	46,80	4	0,16	C
Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 1	gcvPA	J1EZX4	-16,83	14	49,60	3	0,25	C
Proline dipeptidase	Newbould305_2310	J0UJ09	-22,99	14	39,20	4	0,44	C
Bifunctional 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase/chorismate mutase	aroA	J1EZF3	-18,68	23	40,50	4	0,45	C
Aminopeptidase	Newbould305_2446	J1ETE6	-8,35	8	46,80	3	0,14	C
Cytosol aminopeptidase	Newbould305_1382	J0KSP0	-10,49	9	54,00	3	0,15	C
Histidinol-phosphate aminotransferase	hisC	J1EW94	-9,73	7	39,70	2	0,14	U
Uncharacterized protein	Newbould305_0930	J0L1M4	-20,58	26	21,20	4	0,40	U
Nucleotide transport and metabolism								
Phosphoribosylamine--glycine ligase	purD	J1EX21	-59,75	30	45,70	9	0,56	C
Deoxyribose-phosphate aldolase	deoC1	J0UM27	-10,78	12	23,40	2	0,18	C

Bifunctional protein PyrR	pyrR	J1ETU6	-25,30	40	19,00	6	0,50	C
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	purK	J0KSZ4	-11,19	10	42,30	3	0,19	C/W
Phosphoribosylformylglycinamide synthase, purS	Newbould305_1509	J0UKY0	-8,85	27	9,80	2	0,40	C
Carbohydrate transport and metabolism								
Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	glpD	J1EU92	-19,57	7	62,20	4	0,18	C
Phosphoglucomutase	Newbould305_2517	J1ESV1	-8,71	4	61,50	2	0,07	C
Lipid transport and metabolism								
Isoprenyl transferase	uppS	J1ETW9	-6,18	18	29,80	2	0,27	C
2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	ispD	J0L191	-18,25	20	26,60	4	0,53	U
Cardiolipin synthase	Cls	J1EU91	-6,68	4	56,30	2	0,11	C/W
Carboxylesterase	Newbould305_2553	J0KNT7	-11,33	7	51,90	3	0,18	C
FMN-dependent NADH-azoreductase	azoR	J1EY78	-22,41	23	23,30	4	0,33	C
Coenzyme transport and metabolism								
Lipoate-protein ligase A	Newbould305_1469	J0UKU6	-25,40	38	37,80	5	0,75	C
Glutamine amidotransferase subunit PdxT	pdxT	J1EVJ4	-10,82	24	20,50	3	0,27	C
Phosphomethylpyrimidine kinase	Newbould305_1105	J0KYU1	-9,42	8	29,80	2	0,15	U
2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	Kbl	J0KYQ9	-5,93	6	42,80	2	0,10	C

Table S3 (continued)

Description ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	panB	J0L0A9	-5,58	9	28,10	2	0,18	U
Inorganic ion transport and metabolism								
Toxic ion resistance protein	Newbould305_2180	J0UHQ3	-17,75	8	43,30	2	0,08	U
Potassium uptake protein	Newbould305_1530	J0KZY5	-19,37	27	24,20	3	0,71	C
Sulfite reductase flavoprotein	cysJ	J0L0D8	-6,24	4	71,50	2	0,10	C/W
Uncharacterized protein	Newbould305_1190	J0KZ16	-17,16	13	23,60	2	0,25	C
Iron compound ABC transporter, iron compound-binding protein	Newbould305_2377	J0UGV2	-22,82	17	34,70	4	0,27	C/W
Aerobactin biosynthesis protein	Newbould305_1550	J0UJ25	-34,20	16	75,90	8	0,28	C
Cysteine synthase A protein	Newbould305_0655	J1EY01	-20,51	21	35,80	4	0,45	C
Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism								
Surfactin/siderophore synthetase	Newbould305_0718	J0UM69	-6,84	1	273,80	3	0,04	C
Surface protein	Newbould305_0674	J0L0X0	-61,75	52	26,40	9	2,43	W
POORLY CHARACTERIZED								
Uncharacterized protein	Newbould305_1141	J1EW07	-34,43	45	18,50	6	1,17	U
UPF0042 nucleotide-binding protein Newbould305_1300	Newbould305_1300	J0KZB2	-15,86	20	34,70	5	0,33	C

Putative ATP-dependent protease protein	clpB	J0KSR9	-26,17	10	98,20	4	0,13	C
Uncharacterized protein	Newbould305_1086	J1EVU8	-23,52	40	20,80	4	0,40	U
Uncharacterized protein	Newbould305_2029	J1EU25	-9,56	44	8,10	2	3,00	U
Uncharacterized N-acetyltransferase Newbould305_1819	Newbould305_1819	J1ETJ0	-11,42	34	16,90	3	0,67	U
Uncharacterized protein	Newbould305_0962	J0KUT2	-4,97	3	57,40	2	0,09	S
Uncharacterized protein	Newbould305_1304	J0UKG2	-6,23	7	34,20	2	0,13	U
UPF0297 protein Newbould305_0263	Newbould305_0263	J0KVR6	-4,37	28	10,20	2	0,50	U
Probable transcriptional regulatory protein	Newbould305_1196	J1EW64	-18,29	23	26,20	3	0,83	C
Lipoprotein	Newbould305_2546	J0KVT0	-9,85	17	17,20	2	0,33	U
GTPase obg	obgE	J0UNR6	-7,85	6	47,10	2	0,08	C
Gamma-hemolysin component A	hlgA	J0KNX1	-9,58	17	36,30	3	0,23	S
Leukocidin S subunit	Newbould305_2380	J0KP92	-109,17	46	40,20	18	1,88	S
Leukocidin F subunit	Newbould305_2381	J1ET76	-84,54	38	38,60	11	1,27	S
Superantigen-like protein	set19	J0UMW3	-9,75	20	39,80	4	0,35	S
Extracellular matrix and plasma binding protein	Newbould305_1324	J0UKH8	-60,09	31	38,30	13	1,45	W
Superantigen-like protein	Newbould305_1808	J0KPN6	-21,78	18	27,70	3	0,44	S
Ribosome biogenesis GTPase A	rbgA	J0KQ05	-6,98	15	33,30	2	0,20	C
PilT domain-containing protein	Newbould305_1050	J0KYN4	-19,80	21	38,80	3	0,36	C/W
Immunoglobulin G binding protein A (Protein A)	Spa	J1EXZ6	-184,02	43	56,80	20	2,16	W
Alkaline shock protein 23	asp23	J0KY19	-8,16	18	19,10	2	0,29	U
tRNA modification GTPase MnmE	mnmE	J0ULU6	-9,88	5	51,20	2	0,14	C
7-cyano-7-deazaguanine synthase	queC	J0KSC2	-10,29	11	24,80	2	0,17	C
5'-nucleotidase, lipoprotein e(P4) family protein	Newbould305_0857	J1EYC5	-10,45	15	33,30	3	0,57	U

Table S3 (continued)

Description ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
GTP cyclohydrolase F0E2	folE2	J0KRT2	-10,18	14	33,30	3	0,19	C

^a : Proteins of each strains are classified in COG. Names are given according to annotation of genome sequences

^b : Correspond to the commonly found name of the gene

^c : Accessions numbers are given according to references on UniProtKB (<http://www.uniprot.org>)

^d : Probability of critical error in the protein identification given by the X!Tandem software

^e : % of the protein covered with the identified peptides

^f : Theoretical mass as predicted from the protein sequence

D. Bouchard, 2013

Chap II. Comparaison des souches de *S. aureus*

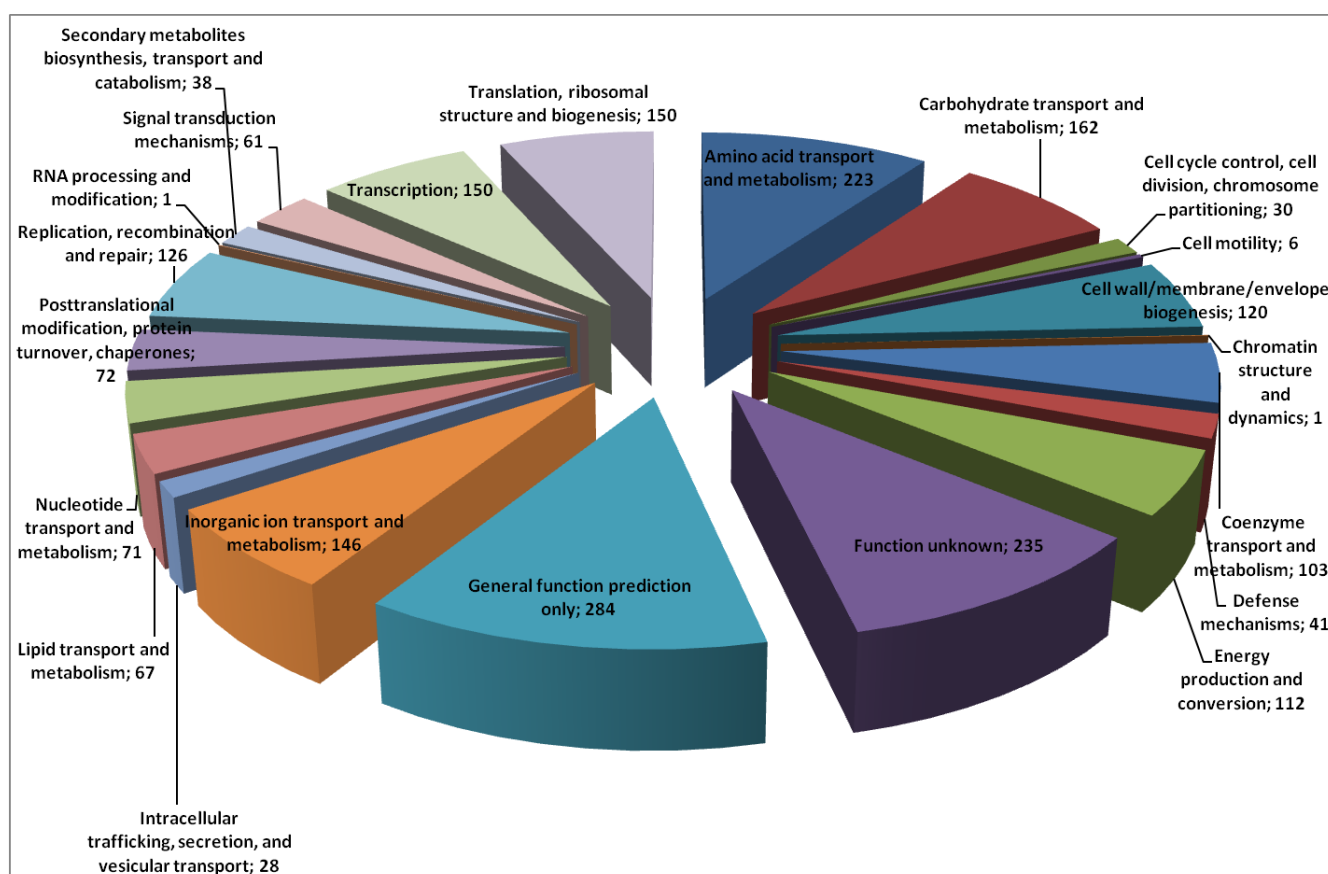
^g : Number of identified peptides

^h : Protein abundance index

ⁱ : Predicted localisation based on PSORTb software. S=Extracellular C=Cytoplasmic C/M=Cytoplasmic/Membrane W=Cell wall U=Unknown

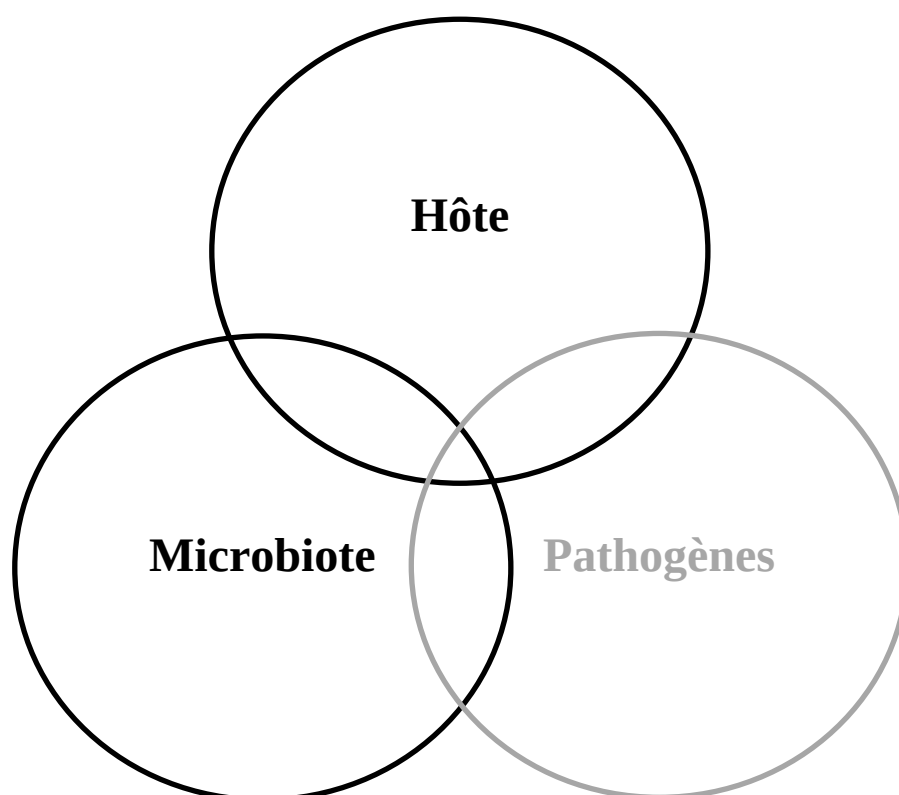
Figure S1: Protein classification of *S. aureus* Newbould 305 in the biological process

Assignment of protein function to ORFs of the two genomes (New bould and RF122) was performed manually using results from BLASTP, and the COG (Clusters of Orthologous Groups, Tatusov et al., 2000). The COGs distributions were similar among the four species. However, the most abundantly represented categories are linked to Amino acid transport and metabolism in both strains, and the percentage of genes encoding transposases and their inactivated derivatives (COG L) was 5.5 % of the total genes with COGs classifications in Newbould305



CHAPITRE III

Diversité de la flore lactique mammaire et caractérisation de leur potentiel probiotique



Les mammites chez les ruminants représentent encore aujourd'hui un problème sanitaire majeur pour les élevages, malgré l'amélioration des conditions d'hygiène lors de la traite. Outre l'impact sur le bien-être animal, ces infections intra-mammaires représentent de lourdes pertes économiques pour l'ensemble de la filière laitière (Bradley et al., 2002 ; Boutet et al., 2005 ; Fox et al., 2009 ; Sordillo et al., 2011).

Nous avons précédemment vu que *S. aureus* représente l'un des principaux pathogènes impliqués dans les mammites. Il provoque des infections intra-mammaires de degrés de sévérités variables, et surtout, évoluant fréquemment vers la chronicité (Hensen et al., 2000 ; Bannerman et al., 2004 ; Viana et al., 2010).

A l'heure actuelle, la prévention (vaccinale) ou le traitement (antibiothérapie) se montrent peu efficaces à l'encontre de ce pathogène (échappement face au système immunitaire et antibiorésistance) (Barkema et al., 2006 ; Pereira et al., 2010 ; Wallemacq et al., 2010 ; Sandholm et al., 1990). De plus, les risques d'émergence et de propagation de souches résistantes aux antibiotiques ont conduit le ministère de l'agriculture à mettre en place un plan EcoAntibio 2012-2017, visant à un usage prudent et raisonné des antibiotiques, se traduisant par des objectifs qualitatifs et quantitatifs : réduire de 25 % en 5 ans, l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire. Dans ce contexte, il existe donc aujourd'hui une réelle nécessité de moyens de lutte alternatifs contre les mammites, moyens préventifs et curatifs.

L'un des concepts alternatifs émergent pour la lutte contre les mammites, repose sur le principe de « lutte biologique ». La mise en évidence de liens existant entre la composition d'un microbiote donné et la santé de l'hôte est à l'origine d'un réel intérêt pour les approches écosystémiques de gestion de la santé humaine et animale et le développement de solutions probiotiques. Ceci se traduit d'ailleurs par une expansion du marché des probiotiques, de 24 milliards de dollars en 2011 à une estimation autour de 36 milliards de dollars en 2017 d'après l'agence Markets and Markets (<http://www.marketsandmarkets.com/nutraceutical-wellness-food-market-research-70.html>).

Les probiotiques, présentant un effet bénéfique pour la santé, sont de plus en plus utilisés dans les écosystèmes naturels, tels que l'écosystème intestinal ou vaginal (Reid G., 1999 ; 2002 ; 2006 ; Falagas et al., 2006 ; Ouwehand et al., 2002). Ces deux écosystèmes, qui sont

sans aucun doute les mieux caractérisés chez l'Homme, renferment un microbiote diversifié. Au sein de ce microbiote existe un équilibre fragile entre des espèces de pathogènes opportunistes (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*...) et commensales non pathogènes (*Lactobacillus sp*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*...), permettant le maintien d'une homéostasie de la réponse immunitaire innée et adaptative au sein de cet écosystème (Cribby et al., 2004 ; Nader-Macias et al., 2008). Ce fragile équilibre repose généralement sur la présence dans ces écosystèmes de microflore assurant le rôle de barrière microbiologique vis-à-vis des pathogènes potentiels (Reid G., 1999 ; 2002 ; 2006). La perte de cet équilibre conduit à l'apparition d'une dysbiose, définie comme une modification de la composition et/ou de l'abondance des populations bactériennes endogènes. Ce déséquilibre peut ainsi augmenter le risque, la fréquence et aussi l'intensité des infections par des espèces pathogènes (Garn et al., 2013).

Dans ces cas précis, il a été prouvé que l'introduction de probiotiques favorise un retour à un état d'équilibre et permet de restaurer l'effet barrière (Ouwehand et al., 2002). Les probiotiques sont idéalement isolés de l'écosystème ciblé et supposés, de ce fait, mieux adaptés à cet environnement. L'ajout dans l'écosystème de probiotiques peut alors favoriser l'élimination ou limiter l'implantation du pathogène et *a posteriori*, réduire les symptômes associés aux désordres (Ouwehand et al., 2002). L'effet protecteur assuré par les flores probiotiques peut reposer, soit sur un effet direct sur les flores pathogènes, par exemple, via une inhibition de la croissance bactérienne ou bien même de sa virulence, soit un effet indirect, par exemple via une compétition nutritionnelle, une occupation de la niche écologique et donc des sites de colonisation du pathogène, ou bien encore via une stimulation du système immunitaire de l'hôte favorisant l'élimination du pathogène (Cf Chapitre I-D ; Reid G., 2001 ; Ouwehand et al., 2002).

Parmi les souches bactériennes à effet bénéfique sur la santé de l'hôte, les bactéries lactiques, et plus précisément, les *Lactobacillus*, représentent des candidats de choix, en raison du statut QPS et/ou GRAS qui leur est souvent associé. En outre, les effets bénéfiques des BL sont largement rapportés dans les contextes intestinal et vaginal, en particulier chez l'Homme (Cf Chapitre I-D). Les bactéries lactiques sont largement utilisées également dans des solutions probiotiques pour les animaux même si les mécanismes sous-jacents sont moins caractérisés. Un chapitre de livre est en cours préparation mettant en avant l'utilisation de bactéries lactiques en production et santé animale (Bouchard et al., en préparation)

Chez les ruminants laitiers (vache essentiellement), l'intérêt pour les différents microbiotes -associés au rumen, au vagin ou à la mamelle- est grandissant et ces microbiotes sont de mieux en mieux caractérisés, notamment avec la mise en place d'approches métagénomiques (Cf Chapitre I-D). En particulier, le microbiote mammaire bovin a été caractérisé par pyroséquençage des ADN16S à des fins essentiellement de diagnostic (Oikonomou et al., 2012). Ces études sur le microbiote mammaire chez le bovin mettent l'accent sur une corrélation entre composition/abondance de l'écosystème et l'état sanitaire de l'animal. Ces observations témoignent que la notion de dysbiose peut s'appliquer à l'écosystème mammaire. Par conséquent, l'utilisation d'une approche probiotique pour la prévention ou le traitement des mammites semble une alternative pertinente. D'ailleurs, les premières études sur modèle bovin réalisées en Irlande et en Argentine ont montré des résultats très prometteurs avec des BL dans les 2 cas (Cf Chapitre I-D) (Klostermann et al., 2008 ; Crispie et al., 2008 ; Frola et al., 2012).

Dans ce contexte, notre objectif était de mieux caractériser la composante lactique de l'écosystème mammaire bovin et d'évaluer son potentiel probiotique dans le cadre de la prévention et du traitement des infections opportunistes de la glande mammaire.

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats d'une campagne de prélèvements qui a permis l'isolement de bactéries lactiques issues de l'écosystème mammaire bovin et la caractérisation de certaines de leurs propriétés en lien avec leur potentiel probiotique. La campagne de prélèvements et d'identification a été réalisée au premier trimestre 2012, dans le cadre du stage de Master de Taous Saraoui, que j'ai encadrée, et en collaboration avec InterBioBretagne, une association pour le développement de l'agriculture biologique en Bretagne, qui nous a permis de réaliser notre campagne de prélèvements sur 2 exploitations appartenant à son réseau d'agriculteurs. Cette campagne de prélèvements est résumée dans l'article ci-dessous et a fait l'objet d'une publication de vulgarisation dans une brochure destinée aux membres du réseau InterBioBretagne (Cf Annexe II). Le travail de caractérisation des souches a été partagé entre Bianca Seridan, doctorante dans l'équipe et moi-même. Les critères que nous avons recherchés sont ceux généralement retenus pour le développement de souches probiotiques (Reid et al., 1999 ; 2001 ; 2002 ; 2006).

Les propriétés de surfaces des souches, notamment leur hydrophobicité et leur capacité d'auto-agrégation ont été déterminées. Ces propriétés leur confèrent une capacité accrue d'interaction avec l'épithélium de l'hôte, mais aussi avec le microbiote et les

microorganismes pathogènes. Cette titration du pathogène limite sa capacité à envahir les tissus (Reid et al., 2001 ; 2002 ; Kmet et al., 1997).

L'inhibition de la croissance des flores pathogènes est aussi un critère avantageux pour les souches probiotiques (Espeche et al., 2012 ; Nader-Macías et al., 2008). Cette inhibition repose sur des composés bactériostatiques ou bactéricides sécrétés dans le surnageant par la BL, tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou encore les bactériocines pour ne citer que les principaux.

Les propriétés de surface ainsi que le potentiel inhibiteur des souches de BL ont été déterminées lors d'un séjour d'un mois que j'ai réalisé au sein de l'équipe de Fatima Nader-Macias au CERELA en Argentine dans le cadre d'un projet ECOS-Sud.

Un critère essentiel d'une souche probiotique est d'avoir la capacité d'entrer en compétition avec le pathogène pour les sites d'attachement présents à la surface de l'épithélium de l'hôte. Les pathogènes, notamment intracellulaires, comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* ou encore *Staphylococcus aureus*, ont la capacité d'adhérer et d'internaliser dans le tissu via des récepteurs membranaires. Inhiber ces étapes du processus infectieux permet de limiter l'implantation du pathogène dans la niche écologique cible. Par conséquent, les capacités d'adhésion et d'internalisation des souches de BL constituent un critère intéressant à explorer.

Enfin, la capacité des BL à moduler le système immunitaire de l'hôte est maintenant bien reconnu dans de nombreux écosystèmes et notamment dans le contexte mammaire (Klostermann et al., 2008 ; Frola et al., 2012). Le potentiel immunomodulateur des souches de BL a été déterminé sur modèle cellulaire (PBMC humain) en collaboration avec l'équipe de Philippe Langela (INRA, Jouy-en-Josas). L'identification de leur potentiel pro- ou anti-inflammatoire peut permettre leur utilisation dans la prévention ou le traitement des infections bactériennes et, en particulier, de l'inflammation qu'elles provoquent au sein de l'organe cible (ici, la glande mammaire).

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une publication scientifique en préparation et présentée ci-après. Les résultats des expérimentations d'immunomodulation n'étant pas encore totalement disponibles, ils ne sont pas intégrés dans le manuscrit. Ces travaux conduiront à la sélection de souches de BL de l'écosystème mammaire présentant un bon potentiel probiotique et dont la caractérisation sera poursuivie.

Probiotics potential of Lactic Acid Bacteria isolated from bovine mammary microbiota: Potential allies against bovine mastitis.

Running title: Probiotic properties of lactic acid bacteria from mammary microbiota

Bouchard Damien S^{1, 2, *}, Seridan Bianca^{1,2,3, *}, Saraoui Taous, Rault Lucie^{1, 2}, Chain Florian⁵, Gonzalez Morano Candelaria⁴, Victoria Chuat^{1, 2}, Langella Philippe⁵, Otero Claudia⁴, Nader-Macias Fatima ME⁴, Jacques Nicoli³, Le Loir Yves^{1, 2, †} and Even Sergine^{1, 2, †}.

¹INRA, UMR 1253 STLO, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France.

²Agrocampus Ouest, UMR1253 STLO, 85 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, Departamento de Microbiologia. Belo Horizonte, Brasil

⁴CERELA-CONICET, Centro de Referencia por los Lactobacillus, Tucuman, Argentine

⁵INRA-MICALIS, Jouy-En-Josas, France

corresponding author

Tel.: +33 (0) 2 23 48 59 04

Fax: +33 (0) 2 23 48 53 50

E-mail: sergine.even@rennes.inra.fr

†: YLL and SE share credit in senior co-authorship

*: DB and SB equally contributed to this work

Correspondance address:

Sergine Even, UMR 1253 STLO, INRA-Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France

Keywords: Mammary microbiota, Lactic Acid Bacteria, mastitis, ruminants

Abstract

Bovine mastitis is a costly disease in dairy cattle worldwide. Prevention and treatment of mastitis, mainly based on antibiotics, are not fully efficient, especially towards *S. aureus* mastitis. In the recent years, the use of probiotic microorganisms to prevent infections in humans and animals has gained interest. The goal of this study was to isolate autochthonous lactic acid bacteria (LAB) from the mammary ecosystem exhibiting beneficial properties that could be used for mastitis prevention or treatment. Sampling of the teat canal ecosystem led to the isolation of 165 strains belonging mainly to enterococci, streptococci, lactobacilli and lactococci. A selection of 22¹ non redundant LAB strains –as determined by PFGE– corresponding to non pathogenic species were further characterized, with regard to their surface properties (hydrophobicity, autoaggregation), antimicrobial compounds production, capacities of adhesion/internalization to bovine mammary epithelial cells, immunomodulatory properties². This study allowed the selection of promising candidate LAB strains from the bovine udder ecosystem, that harbored beneficial properties for the prevention or treatment of bovine mastitis.

¹ Note aux membres du jury : En attente des données de PFGE, chiffre à ajuster

² Note aux membres du jury : Dosages en cours au moment de la rédaction du manuscrit.

Introduction

Bovine mastitis is defined as an inflammation of the mammary gland and most often results from bacterial infection. These intramammary infections cause huge economic losses in the farming and dairy industry (Contreras and Rodriguez, 2011; Le Maréchal et al., 2011). As of yet, the control of bovine mastitis is mainly based on prevention (Rodrigues and Ruegg, 2005) by the application of systemic or local therapies (pre- and post-milking teat dipping) such as the use of an iodine-based solution to decreased post-milking contamination. Despite those improvements of sanitary conditions during milking, mastitis is not fully under control. Currently, antibiotics are the only effective treatment solution but they are not totally efficient and lead to the production of residues in milk which alter milk quality and the transformation processes (Barkema et al., 2006; Le Maréchal et al., 2011). They also contribute to the emergence and transmission of antibiotic resistance within the ecosystems, which include both commensal and opportunistic pathogens. There is thus a need for alternative strategies, which could be used as prophylactic treatment or as an alternative or a complementary curative treatment.

One of these alternatives is the emerging concept of mammary probiotics. For this purpose, LAB are good candidates due to their GRAS status and their recognized technological and inhibitory properties. LAB have been investigated for many years for their beneficial effects on the host health (Behnsen et al., 2013; Falagas et al., 2008; Ouwehand et al., 2002; Reid, 1999; Reid, 2006; Reid and Burton, 2002). They contribute to maintain the balance of natural ecosystems (i.e. vaginal and intestinal). These ecosystems are based on complex bacterial communities, which need to be balanced to exert their beneficial effects (Garn et al., 2013; Ouwehand et al., 2002). In the event of a disruption of the balance, a dysbiosis occurs and leads to an elevated risks of contamination or infection. In case of dysbiosis, the use of probiotics to restore bacterial balance is a significant way that has already been developed in several human ecosystems (Garn et al., 2013).

Likewise, ecosystemic approaches and use of probiotics have gained interest in the veterinary community. Some reports have been published on the identification of micro-organisms from the bovine teat canal, either by isolation on culture media or by 16S rRNA sequencing, to identify bovine mammary autochthonous bacteria with inhibitory properties against mastitis pathogens (Gill et al., 2006; Woodward et al., 1987). Similarly, LAB isolated from the vaginal ecosystem have been proved to exert antagonism against pathogens involved in urogenital infections. Recently, a bacteriocin producing *Lactococcus lactis* was shown to be as efficient as a conventional antibiotic treatment to treat mastitis (Beecher et al., 2009;

Crispie et al., 2008; Klostermann et al., 2008). Encouraging results were also obtained with a strain of *Lactobacillus perolens*, which was shown to inhibit, *in vitro*, several mastitis causing pathogens thanks to its coaggregation and colonization capabilities to bovine epithelial cells (Espeche et al., 2012). This strain, when used in *in vivo* intramammary injection, did not show negative effect on mammary tissue (Frola et al., 2012; Frola et al., 2013). Similarly, we have recently demonstrated *in vitro* that *Lactobacillus casei* strains, including one strain isolated from bovine teat canal, inhibits adhesion and internalization of *S. aureus* to bovine mammary epithelial cells without affecting the physiology of these cells (Bouchard et al., 2013a).

Based on these observations, the objective of this work was to isolate LAB from the bovine mammary ecosystem, and to characterize their properties so as to select good candidates as potentially beneficial strains to be included in a mammary probiotic cocktail against infectious mastitis.

Material and methods

Sampling

The samples were collected in two herds belonging to the InterBioBretagne network, in the region of Brittany in France. One quarter per cow was sampled, corresponding to the left or right rear quarter. The health status of quarters was defined in terms of somatic cells counts and local signs of inflammations. Finally, 20 cows were sampled, half of them showing signs of mastitis, either clinical or subclinical. After thoroughly washing the teat with water and ethanol 70 %, the teat canal was sampled by two different ways. A 5 mm Histobrush® swab (D. Dutscher, Brumath, France), was inserted 5 mm inside the teat and turned 3 times before removal. The swabs were immediately placed in tubes containing 2 mL of sterile peptone solution (peptone 20 g/L sodium chloride 5 g/L). Samples of foremilk were then collected to identify the flora of the teat cistern. All sample were stored on ice until processing in the laboratory. An additional milk sample was collected for SCC determination.

Bacterial analysis of foremilk samples

Bacterial composition of foremilk samples was determined by plating on selective media. Milk samples were homogenized with 9 volumes of a trisodium citrate solution (2 % w/v) and centrifuged (6650 g / 5 min / 4 °C). Pellet containing bacteria was then resuspended in 2 mL of sterile tryptone water (20 g/L). Part of this suspension was used for isolation of LAB and the other for microbiological analysis. The bacterial suspension was plated on Plate Count Agar (Allonne, Beauvais, France), MacConkey Agar (Torrejon de Ardoz, Madrid, Spain), Mannitol Salt Agar (Torrejon de Ardoz, Madrid, Spain), and incubated at 37 °C for 24 h for enumeration of total mesophilic flora, Enterobacteria and Staphylococci. The bacterial suspension was spread on M17, MRS at pH 6.8 and MRS acidified at pH 5.4 (hereafter named MRS 5.4, more selective for Lactobacilli) and incubated for 48 h at 37 °C in an anaerobic jar for the enumeration.

Isolation of LAB strains

Bacterial suspensions corresponding to swab and were enriched on M17, MRS or MRS 5.4 by diluting 100 µL of bacterial suspension in 12 mL of M17, MRS or MRS 5.4, followed by a 48 h incubation at 37 °C in anaerobic jar. Serial dilutions of the enriched bacterial suspension were then performed before plating on M17, MRS and MRS 5.4 as described above.

Colonies with different morphotypes were isolated and set in collection in the enrichment medium added by 15 % glycerol and stored at -80 °C.

DNA extraction and genetic identification

Genomic DNA was isolated from a 2 mL overnight culture on M17, MRS or MRS 5.4 after centrifugation (6000 g / 5 min / 4 °C), washing with 1 mL of peptone solution and an additional centrifugation (6000 g / 5 min / 4 °C). The pellet was lyzed and gDNA was purified with the kit DNeasy® Blood & Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. Quantification of DNA and protein contamination was evaluated using a NanoDrop (Spectrophotometer, Labtech, France) by measuring the OD at 260 and 280 nm. Each DNA isolates were then identified at species level by specific 16S PCR amplification.

Bacterial surface properties

Autoaggregation capacities and surface hydrophobicity were determined as described previously (Espeche et al., 2012). Strains were classified as low, medium and high according to their hydrophobicity or autoaggregative capabilities.

Production of hydrogen peroxide

The screening of hydrogen peroxide production by the isolates was performed using a colorimetric assay on agar plates, as described by Juárez-Tomás et al. (Juarez-Tomas et al., 2003; Juarez-Tomas et al., 2004). Strains were classified, according to the intensity of their color, as non-producers, low producers or high producers of H₂O₂.

production of antagonistic substances

The screening of the antimicrobial characteristics of the LAB supernatants was performed by applying the agar plate diffusion method as previously described (Juarez-Tomas et al., 2003). Supernatants were either native, neutralized with NaOH or neutralized and treated with 1000 U/mL of catalase (Sigma Aldrich, USA) during 1 h at 25 °C. Six pathogenic strains, corresponding to the main species involved in bovine mastitis, were used as indicators: *Staphylococcus aureus* RF122 and Newbould 305 (N305), which have been isolated from bovine mastitis (Bouchard et al., 2012; Herron-Olson et al., 2007; Prasad and Newbould, 1968), *Streptococcus uberis* LMA1675 and LMA1672 and *Escherichia coli* LMA1678 and LMA 1674. *S. uberis* and *E. coli* strains were isolated from the mammary ecosystem during

this study, *S. uberis* LMA1672 and *E. coli* LMA1678 were isolated from healthy quarters and *S. uberis* LMA1675 and *E. coli* LMA1676 from infected quarters.

Mammary epithelial cells and culture conditions

The established bovine mammary epithelial cell (MAC-T) line (Nexia Biotechnologies, Quebec, Canada) has been widely used for invasion assays and thus was retained for this study. MAC-T cells were cultured in T75 cell culture flasks in DMEM containing 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, and 5 µg/mL insulin (D. Dutscher). Cells were incubated at 37°C in a humidified incubator with 5 % CO₂. They were cultured to a confluent monolayer, treated with 0.05 % trypsin (Gibco-BRL, Grand Island, NY), and suspended in fresh MAC-T medium at a concentration of 2x10⁵ cells/mL. For adhesion and internalization assays, cells were then seeded in 12-well plates (2x10⁵ cells/well) and incubated overnight at 37°C in 5 % CO₂ to obtain a confluent monolayer.

Adhesion and internalization assays.

Adhesion and internalization assays were performed as described in Bouchard et al. (Bouchard et al., 2013a). Using confluent monolayers of MAC-T cells (2.5x10⁵ cells/well) and LAB suspension in DMEM at 1x10⁸ CFU/mL or 5x10⁸ CFU/mL to achieve a ratio of interaction (ROI; ratio of LAB organisms to cells) of 400:1 or 2,000:1. LAB adhesion and internalization were measured 1 h and 2 h post-infection respectively. The population of LAB that adhered or internalized was determined on M17 for lactococci and MRS for lactobacilli using a micromethod as previously described (Bouchard et al., 2013a).

Immunomodulatory effects of LAB strains on PBMC model

Human PBMCs were obtained from four healthy donors and isolated as previously described (Foligne et al., 2007; Holvoet et al., 2013). The cytokine induction pattern was evaluated as previously described (Kechaou et al., 2013). The LAB strains were grown twice for 16h at 37°C in M17 or MRS to reach the early stationary phase. They were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in PBS. The bacterial density was adjusted to OD₆₀₀ =1 (corresponding to approximately 5x10⁸ CFU/mL). PBMCs (1x10⁶ cells/mL) were seeded in 24-well tissue culture plates. Bacterial suspension were added to obtain a bacterium/cell ratio of 10:1. PBS was used as a negative (non stimulated) control. For each donor, three wells per bacterial strain were used. After 24 h stimulation at 37°C in air with 10 % CO₂, culture supernatants were collected, mixed with anti-protease cocktail as indicated by

manufacturer (cOmplete, EDTA-free tablets, Roche) and stored at -80°C until cytokine analysis. Neither medium acidification (red phenol as pH marker) nor bacterial proliferation was observed. IL-10 and IL12p70 concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Mabtech, Sweden) according to the manufacturer's recommendations.

Immunomodulatory effects of LAB strains on HT-29 cell line

Experiments were performed as previously described (Kechaou et al., 2013). Briefly, experiments were initiated when cells were at confluence ($\sim 1.83 \times 10^6$ cells/well). LAB were added at a multiplicity of infection (MOI) of 40 in 50 μL DMEM in a total volume of 500 μL . Cells were stimulated simultaneously with recombinant human TNF- α (5 ng/mL; Peprotech, NJ) for 6 h at 37°C in 10 % CO_2 . All samples were analyzed in triplicate in three independent assays (9 data points in total including 3 technical replicates per assay). After cocubation, cell supernatants were collected, mixed with anti-protease cocktail as indicated by manufacturer (cOmplete, EDTA-free tablets, Roche) and frozen at -80°C until further analysis of interleukin-8 (IL-8) concentrations by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Biolegend, San Diego, CA).

Statistical analysis

Each experiment was done in triplicate (biological repeats). Statistical analysis was performed with R software (R Development Core Team, 2007). The differences in adhesion and internalization capacities among strains were assessed using one-way analysis of variance. Strains were then grouped using the Tuckey's range test.

Statistical correlation were determined using the Pearson's correlation coefficient.

Results

Diversity of Lactic Acid Bacteria within bovine mammary ecosystem

Sampling of teat canal of 20 cows in two farms in Bretagne (West of France) led to the isolation and identification of 165 clones. Out of this, 76 clones were considered as non-redundant, considering only one clone per species and per cow. These clones mainly corresponded to LAB, including enterococci (28.9 %), streptococci (28.9 %), lactobacilli (22.4 %) and lactococci (6.6 %) (see table 1 in supplemental data). In terms of presence/absence of a given species with regard to the sanitary status of the udder, the same species were isolated in the samples, independently of the health status of cows (data not shown). Streptococcal and enterococcal isolates mainly corresponded, respectively, to species generally associated to bovine mastitis (*S. infantarius* and *S. uberis*) and to species generally associated with fecal flora. We thus focused our study on 22 strains belonging to *Lactococcus* and *Lactobacillus* genera, which include 1 strain of *L. lactis*, 4 strains of *L. garvieae*, 4 strains of *L. brevis*, 11 strains of *L. plantarum* and 2 strains of *L. casei*. (Table 1).³

Surface properties of LAB isolated from the bovine mammary ecosystem.

Surface properties, including hydrophobicity and autoaggregation are criteria frequently used for the selection of probiotic strains. We determine these two characteristics for the 22 strains used in this study. *L. casei* BL23 was added as a reference strain as this strain has been previously shown to exhibit probiotic properties in gastrointestinal properties (Maze et al., 2010; Rochat et al., 2007) and we recently demonstrated that this strain was able to inhibit *S. aureus* internalization into mammary epithelial cells (Bouchard et al., 2013a). A great majority of strains (82 %) exhibited low hydrophobic properties. No strain was classified as highly hydrophobic. Interestingly, four strains had medium hydrophobicity, one *L. plantarum* (CIRM-BIA 1610) and 3 *L. brevis* strains (CIRM-BIA 1595, 1606, 1597). Likewise, autoaggregation capacities were low for most strains (91 %). Only two *L. brevis* strains, namely CIRM-BIA 1606 and 1597 had a medium capacity of autoaggregation, and none of the tested strains showed high autoaggregation capacities. The two *L. brevis* with medium capacities of autoaggregation also exhibited medium hydrophobic properties.

³ Note aux membres du jury : Le phénotypage des 22 souches est en cours de réalisation par le CIRM-BIA, par PFGE et RAPD

Colonization properties of LAB

Considering that adhesion capacity of a strain may reflect its ability to compete with pathogens for colonization of host tissues, the ability of LAB to colonize mammary gland tissue was explored by measuring their ability to adhere to bovine mammary epithelial cells (MAC-T cell line). We recently pointed out that *L. casei* had the ability to internalize into epithelial cells (Bouchard et al., 2013). We thus characterized the internalization rates of the LAB isolated in this study as well. This characterization was performed on a selection of 11 strains. *L. casei* BL23 was added to this panel and used as a reference strain. Of note, the cellular layer was not affected by incubation with any of the LAB in the conditions used.

Adhesion capacities of LAB were highly strain-dependant, with differences between strains reaching almost 2 LOG₁₀, independently of the ROI (Figure 1). Inter- and intra-species variability was observed as illustrated for *L. brevis* and *L. plantarum*. Four strains exhibited adhesion capacities significantly higher than that of the others for a ROI of 400:1, namely *L. brevis* CIRM-BIA 1595 and 1597 and *L. plantarum* CIRM-BIA 1608 and 1610. On the contrary, *L. brevis* CIRM-BIA 1613 and the three *L. casei* strains tested (including strain BL23) had significantly lower adhesion capacities. These trends were confirmed at a ROI of 2000:1 albeit with attenuation. Likewise, internalisation capacities of LAB were highly strain-dependant, with differences between strains reaching almost 3 LOG₁₀, independently of the ROI (Figure 2). The four strains exhibiting the highest adhesion capacities also showed the highest internalization capacities at a ROI of 400:1. However, differences were strongly attenuated at a ROI of 2000:1 as only *L. brevis* CIRM-BIA 1595 adhered significantly at a higher rate compared to the others.

Data were further analyzed to determine correlations between surface properties and adhesion/internalization capacities. Adhesion and internalization were clearly correlated at a ROI of 400:1, with a pearson correlation coefficient of 0.89 (supplemental figure 1). In addition, adhesion and internalization at this ROI were correlated to hydrophobic properties, with pearson correlation coefficients of 0.73 and 0.89 (i.e. the more hydrophobic, the more efficient in adhesion and internalization). This trend was much less pronounced at a ROI of 2000:1 as illustrated by a person correlation coefficient of 0.55 between adhesion and internalization (supplemental figure 2). Likewise, at a ROI of 2000:1, correlation between adhesion or internalization and hydrophobicity was low (pearson correlation of 0.59 and 0.5 respectively). Adhesion and internalization were not correlated to autoaggregation properties as illustrated by Pearson's correlation coefficients lower than 0.2, independently of ROI.

Characterization of inhibitory potential against pathogenic bacteria

The potential of the 22 strains to produce oxygen peroxide was measured by the colorimetric method on TMB agar plates. None of the tested strains was found to produce hydrogen peroxide. Production of inhibitory metabolites in the supernatant was tested using the agar plate diffusion method. Supernatants of 64 % of strains were able to inhibit, at least partially, the indicator strains. All *L. casei* and *L. plantarum* strains inhibited the growth of all indicator strains except *S. aureus* N305. On the contrary, no growth inhibition was observed for all the *L. garvieae* and *L. brevis* strains tested. An intermediate inhibitory capacity was observed for the *L. lactis* strain tested. Inhibition was released in all cases when supernatants were neutralized with NaOH, indicating that inhibition was related to organic acid production and subsequent acidification, but not to other antimicrobial compounds such as hydrogen peroxide or bacteriocins. In agreement, strains with the highest acidifying properties inhibited more indicator strains.

Characterization of the immunomodulatory potential of selected lactic acid bacteria (Ongoing)**Discussion**

Mastitis is a major problem in animal health, it deeply affects the dairy production chain and causes huge economic losses. *S. aureus* mastitis often evolves towards a persistent infectious disease. Usually, treatment is based on intramammary injections of antibiotics. However, the use of antibiotics is not fully satisfactory, with low cure rates in *S. aureus* mastitis, and contributes to the risk of emergence and dissemination of antibiotic resistances. Probiotic use is a promising alternative to classical treatments. This strategy has gained interest in the recent years with the emergence of ecosystemic approaches in the management of human and animal health. One criteria pointed out for a probiotic selection is to isolate candidate strains directly from the targeted ecosystem, being assumed these strains will be more adapted to the ecosystem (Bougarn et al., 2011; Nader-Macias et al., 2008a; Ouwehand et al., 2002; Saarela et al., 2000; Zoetendal et al., 2006). The objective of this study was to identify potential candidates, adapted to the ecological niche of the bovine mammary gland, for future application as mammary probiotics.

In this study, we isolated 165 strains from cow's teat canal, mainly identified as *Enterococcus faecium*, *E. hirae*, *Streptococcus infantarius*, *S. uberis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* and *Lactococcus garvieae*. These species have been previously isolated from foremilk samples (Espeche et al., 2009b), although relative amounts of each species appear to vary greatly between sampling campaigns. These variations likely result from differences in herd management and or from sampling procedures. Such variations were indeed reported between two sampling campaigns performed by the same group in two different regions of Argentina (Espeche et al., 2009b; Espeche et al., 2012). Of note, most of the LAB strains identified in this work were isolated in both healthy- and non-healthy quarters (Table 1), indicating that these LAB species are not exclusive of a sanitary status. Characterization of beneficial properties was performed on 22 strains, which were selected based on their non-pathogenic status. Strains isolated in this study and belonging to genera *Enterococcus* and *Streptococcus* as well as *L. garvieae* have been previously described as etiologic agents in cow mastitis and were not retained (Contreras and Rodriguez, 2011; Rodriguez et al., 2011; Zadoks et al., 2011). In addition, phenotyping using RAPD and PFGE was performed to remove redundant strains.

Several beneficial properties were targeted, including direct inhibition of the pathogen growth through the production of antimicrobial compounds, a competition for the mammary gland tissue and stimulation of the innate immune system.

The ability of LAB to produce antimicrobial compounds such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins, has been widely reported in several contexts including bovine vaginal and udder contexts (Charlier et al., 2009; Nader-Macias et al., 2008b). Most of these studies have been undertaken *in vitro* by screening LAB properties but promising results were also obtained *in vivo*. Hence, a intramammary infusion of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* has proven to be as efficient as a classical antibiotic injection (Crispie et al., 2008; Klostermann et al., 2008). In our study, none of the tested LAB strains was able to produce bacteriocins or hydrogen peroxide. As mentioned above, the ability to produce hydrogen peroxide was previously reported for LAB strains isolated from mammary ecosystems (Espeche et al., 2009b; Espeche et al., 2012; Nader-Macias et al., 2008b). However, these producer isolates corresponded to *Streptococcus bovis*, *Weissella paramesenteroides*, *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus*, species which have not been isolated or which were not retained in our study. This can explain this apparent discrepancy. Of note, in these previous studies, production of hydrogen peroxide was not even a general feature of strains isolated from udders, and was less common than for vaginal

isolates, suggesting adaptation of strains or differential selective pressure within each ecosystem (Nader-Macias et al., 2008a). One hypothesis to explain this difference in hydrogen peroxide production capacities between udder- and vaginal-associated LAB is the presence of lactoperoxidase in milk. Lactoperoxidase catalyzes the oxidation of thiocyanate in the presence of hydrogen peroxide and the end products of this reaction have potent antimicrobial effects (Sharma et al., 2013). This activity might account for a selective pressure against oxygen peroxide production in the udder-associated LAB.

In our study, the ability of LAB to produce antibacterial compounds was limited to organic acid production. As a result, the strains with the highest acidifying capacities were those with the highest inhibitory activity against indicator strains, including *S. aureus*, *E. coli* and *S. uberis* strains. Of note, *S. aureus* NB305 was not inhibited by any of the 22 LAB supernatants, suggesting high tolerance of this strain to acid stress compared to the five other strains tested. This strain is known to generate chronic mastitis (Prasad and Newbould, 1968; Bannerman et al., 2005; Hensen et al., 2000). A higher tolerance to acid stress may contribute to its adaptation to host environment and defense mechanisms. Of note, in a healthy mammary gland context, with a balanced ecosystem where LAB are not the dominant microflora (Otero et al., 2006; Otero and Nader-Macias, 2006), pH is close to neutrality - respectively 6.89 and 6.71 for foremilk and stripping milk (Espeche et al., 2009a). Production of organic acids by autochthonous LAB in teat cistern is thus likely limited and cannot exert a barrier effect.

Another criterion to select a candidate probiotic strain is its ability to compete for the niche. The ability of LAB to compete with pathogenic flora for tissue adhesion has been widely documented, especially in the gut and vaginal ecosystems (Even et al., in press). The capacity of our LAB strains to adhere to bMEC was thus evaluated, being assumed that a high adhesion capacity is likely to prevent from colonization by pathogenic microorganisms *in vivo*. A first screening was carried out on the 22 strains using adhesion to hydrophobic solvents tests (hexadecane) (Otero et al., 2004) and the bacterial autoaggregation phenotype (Ocana and Nader-Macias, 2002), which are used to predict the adhesion phenotype. Determination of adhesion and internalization capacities to bMEC was then performed on 11 strains. All together, these results clearly underlined strain-to-strain variations of adhesion capacities. These variations are likely related to the large panel of adhesion determinants identified in LAB. Such determinants are well-documented in Lactobacilli and include

several proteins directly involved in adhesion such as mucus binding proteins (Mub1 and Mub2), mucus adhesion promoting protein (MapA), mannose-specific adhesin (Msa), glucan synthase (Gtf), fibronectin-binding protein (FpbA), collagen-binding protein (Cnb), collagen-binding S-layer (CbsA) or aggregation-promoting factors (Apf), as well as some house-keeping gene products such as elongation factor Tu (ef-Tu), enolase (Eno), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), heat shock protein 60 (GroEL), and sortase (SrtA) (Turpin et al., 2010). The presence of pili structures on some probiotic strains such as *L. rhamnosus* GG, was also found to contribute to mucus-binding activity (Kankainen et al., 2009; Reunanen et al., 2012). Whereas the variations in adhesion capacities we observed in this study are linked to the presence or absence of one or several of such determinants remains to be tested.

Apart from the strong strain-to-strain variability, the determination of adhesion capacities pointed out four strains that exhibited significantly higher adhesion capacity, namely *L. brevis* CIRM-BIA 1595 and 1597 and *L. plantarum* CIRM-BIA 1608 and 1610. For these four strains, adhesion capacity was similar or slightly lower than adhesion capacity of two *S. aureus* strains, namely RF122 and NB305, that we previously tested in the same conditions (Bouchard et al., 2013b). These four strains are thus good candidates to compete at least with one of the most prevalent agent of mastitis for udder colonization. Interestingly, only one strain with high adhesion capacity exhibited autoaggregation property, indicating this property was not a prerequisite, although it has been previously shown that autoaggregation favors colonization of host and tissues (Kmet and Lucchini, 1997; Zhang and Kim, 2013). Autoaggregative strains also present another interest as they may titer pathogenic flora by co-aggregation and facilitate its clearance (Younes et al., 2012). All strains with a medium hydrophobicity exhibited high adhesion capacities. However, this was not the case for *L. plantarum* 1608, which adhered to bMEC at a high rate despite low hydrophobicity, suggesting this surface property may be used to predict the adhesion capacities but that using this sole criterion may also mislead and exclude some interesting strains, as mentioned for autoaggregation.

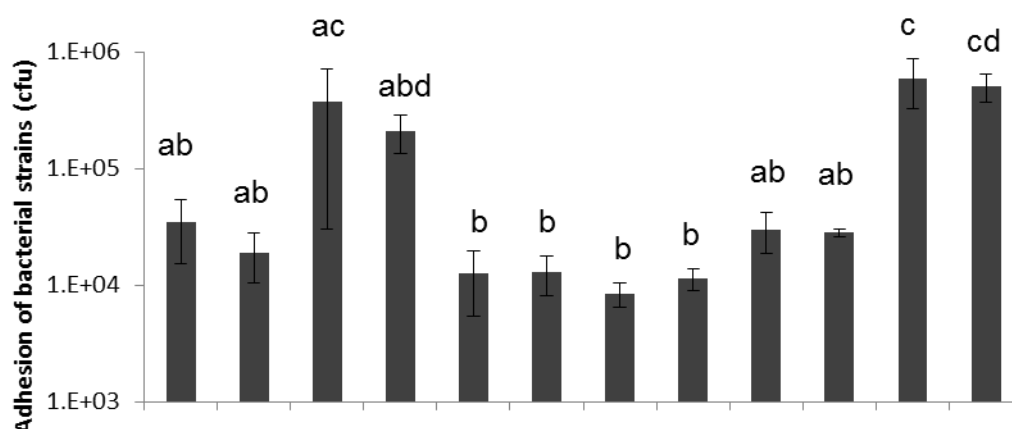
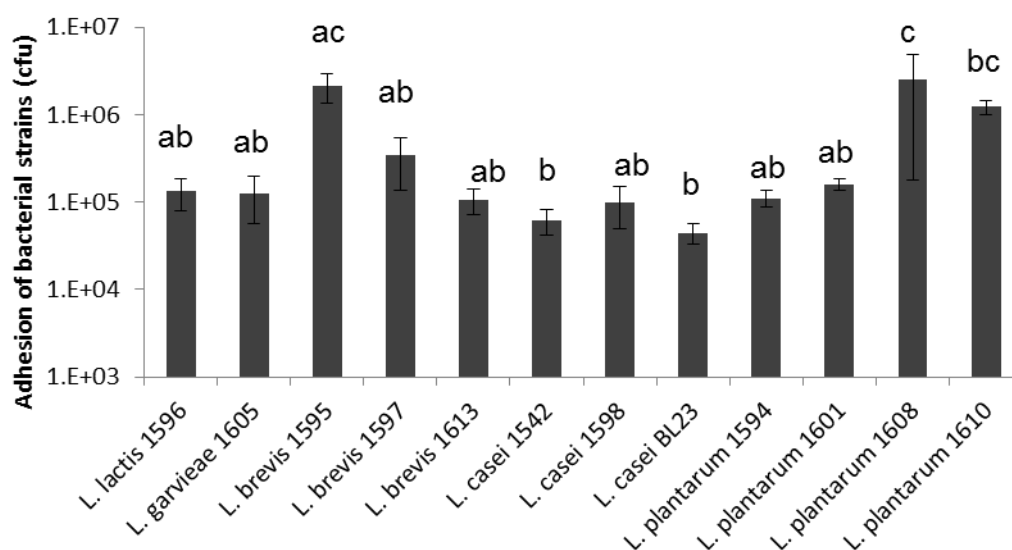
Studies investigating the capacity of LAB to colonize host tissue are generally restricted to the evaluation of their adhesion properties, with the aim to prevent the first step of tissue colonization by pathogen, i.e. adhesion. The existence of an intracellular life is pointed out for an increasing number of pathogenic bacteria. For instance, the existence of an intracellular life for *S. aureus* is now well established, and it is even proposed to explain chronicity of

staphylococcal infections (Almeida et al., 1996; Fraunholz and Sinha, 2012; Qazi et al., 2004). This microbial capacity to internalize and, eventually, survive and proliferate within cells is however still associated to pathogenic bacteria and, as a result, not explored for the so-called “positive bacteria”. Hence, only a few studies report the internalization of LAB and with the aim to use LAB as vehicles for intracellular delivery of molecules (Guimaraes et al., 2006; Innocentin et al., 2009). In this study, the capacity of LAB to internalize was investigated. As observed with adhesion, the ability of LAB strains to internalize was strongly strain-dependant. Internalization capacities of all the tested LAB was lower than that of two *S. aureus* strains isolated from mastitis and tested with the same cellular model (Bouchard et al., 2013a). Rates of internalization were 2- to 1000-fold lower for LAB than for *S. aureus*, although the LAB/bMEC ratio was 4-fold higher.

Internalization was correlated to adhesion and hydrophobicity at a ROI of 400:1, which is in agreement with previous published data on other species (Hensen et al., 2000a; Hensen et al., 2000b). However, for a higher ROI (2000:1), only poor correlation was obtained between both phenomena. For instance, *L. plantarum* CIRM-BIA 1594 and 1608 had similar internalization rates while adhesion capacity was 20-fold higher for *L. plantarum* CIRM-BIA 1608 than for CIRM-BIA 1594. These results indicate that LAB adhesion and internalization cannot be summarized as a chronological process and involve specific interactions between bacterial and cellular determinants, as already observed for other species (Munoz-Provencio et al., 2010; Munoz-Provencio et al., 2012; Turpin et al., 2010; Zhang et al., 2013). As mentioned above, the capacity of the tested LAB to internalize was limited compared to one of the major etiologic agent of mastitis (*S. aureus*), nevertheless it was not neglectable. The use of such a strain -able to internalize- as probiotic raises questions about its possible persistence in the tissue or its role on cellular physiology, cell cycle or epigenetic modifications, as observed with pathogen bacteria, such as *S. aureus* (Alekseeva et al., 2013). On the other hand, it may be part of the positive effect that This question needs further investigations.

Conclusion

The results obtained from this work led to the identification of four LAB strains belonging to *L. brevis* and *L. plantarum* species that were selected based on their capacities to colonize mammary epithelial cells and that are good candidates to serve as mammary probiotics. They will serve as the basis for further studies to evaluate their barrier effect with regard to major mastitis pathogens.

Figure legends**A****B****Fig 1. Adhesion of lactic acid bacteria to bovine mammary epithelial cells.**

Lactic acid bacteria populations adhered to bMEC were determined after 1 h of interaction at a ROI of 400:1 (A) and 2000:1 (B) respectively. Data are presented as mean population per well (i.e., corresponding to 2.5×10^5 bMEC) $\pm$ Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between strains were assessed using a one-way analysis of variance, followed by a Tukey's range test. Letters a, b, c and d indicate homogeneous statistical processing groups that were significantly different according to the Tukey's range test.

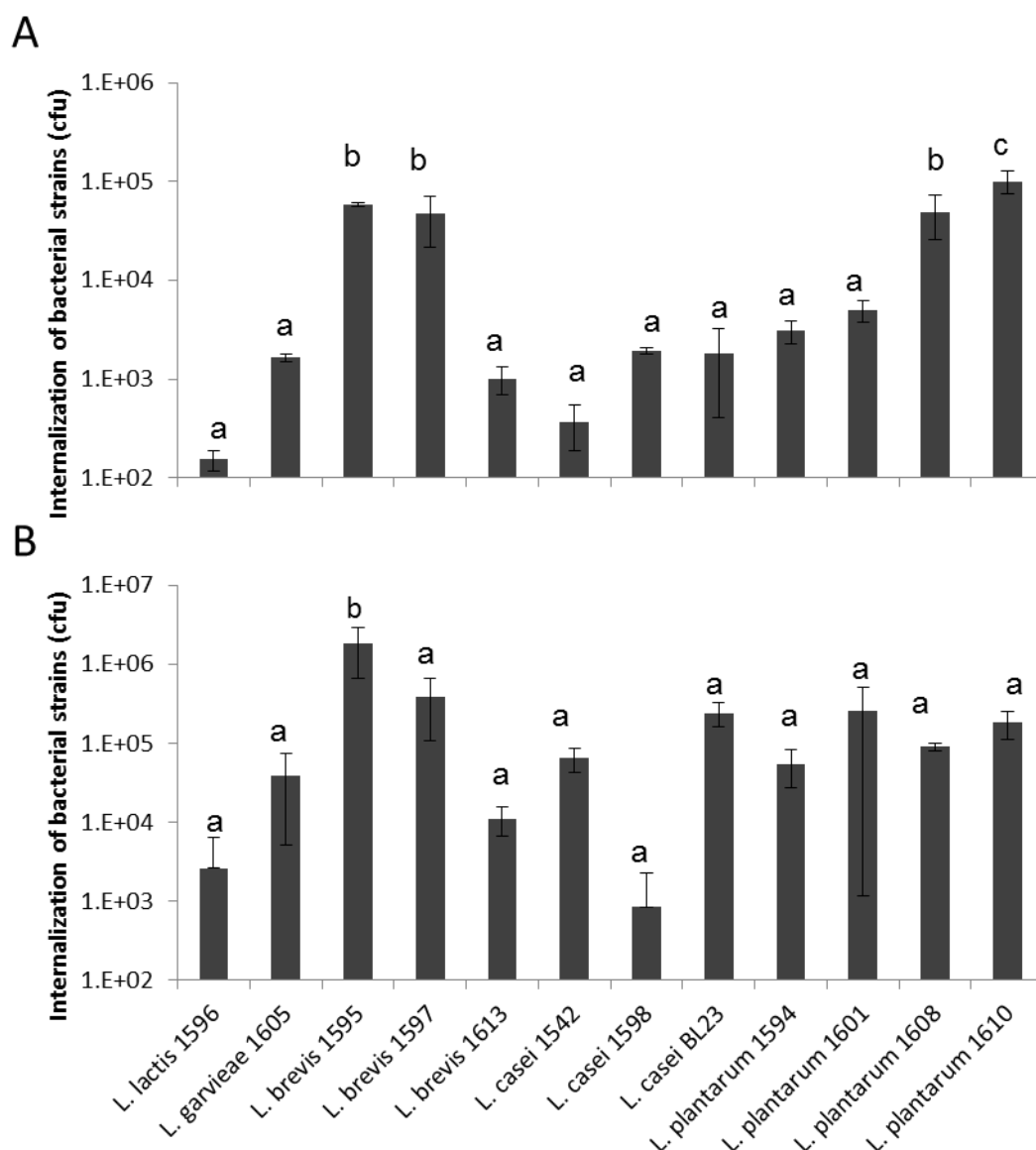
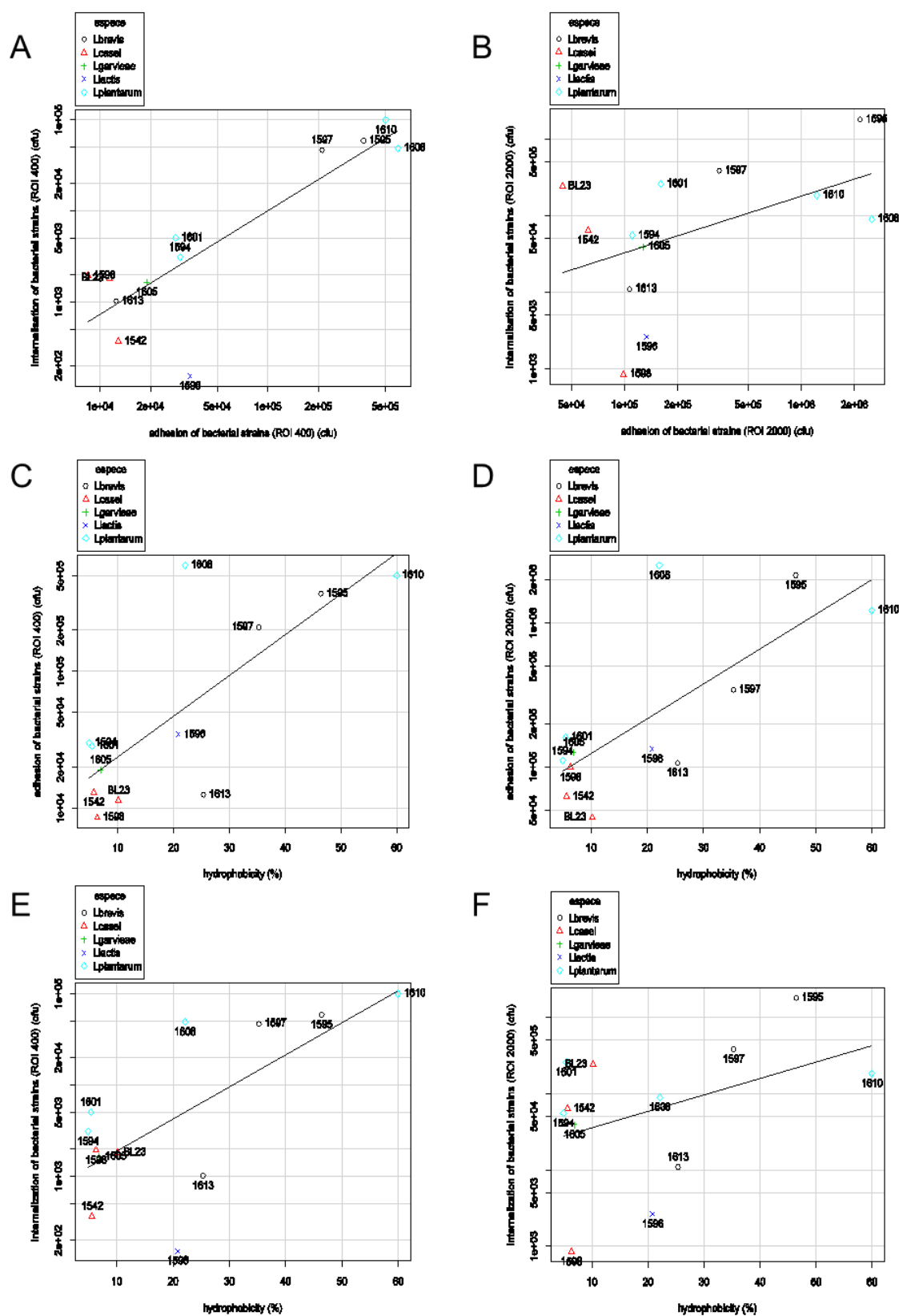


Fig 2. Internalization of lactic acid bacteria into bovine mammary epithelial cells.

Lactic acid bacteria populations internalized into bMEC were determined after 2 h of interaction at a ROI of 400:1 (A) and 2000:1 (B) respectively. Data are presented as mean population per well (i.e., corresponding to $2.5 \cdot 10^5$ bMEC) $\pm$ Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between strains were assessed using a one-way analysis of variance, followed by a Tukey's range test. Letters a, b, c and d indicate homogeneous statistical processing groups that were significantly different according to the Tukey's range test.



Supplemental figure 1

Correlation plots between adhesion and internalization (A, B), adhesion and hydrophobicity (C,D), internalization and hydrophobicity (E,F) for a selection of 11 strains at a ROI of 400:1 (A, C, E) and 2000:1 (B, D, F)

Table 1. Characterization of surface and antagonistic properties of LAB strains isolated from bovine teat canal

name		Health status ^a	sample type	Surface properties				Antimicrobial properties			
				Hydrophobicity		Autoaggregation		H2O2 production	acidification	diffusion test	
Species	CIRM-BIA			% ^b	Gr ^c	% ^d	Gr ^e	TMB test ^f	pH SN ^g	native SN ^g	neutralized SN ^g
<i>Lactococcus lactis</i>	1596	NH	Foremilk	21	L	10	L	NP	4.28	<i>S. aureus</i> RF122 / NB305 <i>E. coli</i> LMA1678 /LMA1674	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	1605	H	Swab	7	L	7	L	NP	4.45	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	1609	H	Swab	7	L	8	L	NP	4.49	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	1604	H	Foremilk	9	L	10	L	NP	4.51	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	1611	NH	Swab	7	L	8	L	NP	4.49	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	1613	NH	Foremilk	25	L	8	L	NP	5.25	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	1595	NH	Foremilk	46	M	15	L	NP	5.23	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i> ⁱ	1606	H	Swab	66	M	69	M	NP	5.22	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i> ⁱ	1597	NH	Swab	35	M	66	M	NP	5.09	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1607	H	Foremilk	7	L	7	L	NP	4.13	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1608	H	Foremilk	22	L	9	L	NP	3.86	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1610	H	Foremilk	60	M	8	L	NP	3.89	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1612	NH	Foremilk	0	L	13	L	NP	3.84	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1594	NH	Swab	5	L	13	L	NP	3.90	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-

Table 1. to be continued

name		Health status ^a	sample type	Surface properties				Antimicrobial properties			
Species	CIRM- BIA			Hydrophobicity		Autoaggregation		H2O2 production TMB test ^f	acidification pH SN ^g	diffusion test ^h	
				% ^b	Gr ^c	% ^d	Gr ^e			native SN ^g	neutralized SN ^g
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1599	NH	Swab	4	L	12	L	NP	4.04	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^j	1600	H	Foremilk	7	L	14	L	NP	3.90	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^j	1593	NH	Swab	7	L	10	L	NP	3.90	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^j	1602	H	Foremilk	7	L	11	L	NP	3.93	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^k	1601	H	Swab	5	L	14	L	NP	3.92	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^k	1603	H	Swab	4	L	7	L	NP	3.93	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus casei</i>	1542	NH	Swab	6	L	14	L	NP	4.10	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus casei</i>	1598	NH	Swab	6	L	16	L	NP	4.09	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-
<i>Lactobacillus casei</i> BL23				10	L	13	L	NP	4.17	<i>S. aureus</i> RF122 <i>E. coli</i> LMA1678/LMA1674 <i>S. uberis</i> LMA1675/LMA1672	-

^a H: healthy, NH: non healthy

^b percentage of hydrophobicity

^c Strains were classified as low (L) or medium (M) according to their hydrophobicity capabilities

^d percentage of autoaggregation

^c Strains were classified as low (L) or medium (M) according to their autoaggregative capabilities

^f NP : non producer

^g SN : supernatant

^h indicator strains inhibited by LAB supernatants in agar plate diffusion test ; “-“ indicates that none of the indicator strain was inhibited.

ⁱ suggested to be the same strain as determined by RAPD (to be confirmed by PFGE, ongoing)

^j suggested to be the same strain as determined by RAPD (to be confirmed by PFGE, ongoing)

^k suggested to be the same strain as determined by RAPD (to be confirmed by PFGE, ongoing)

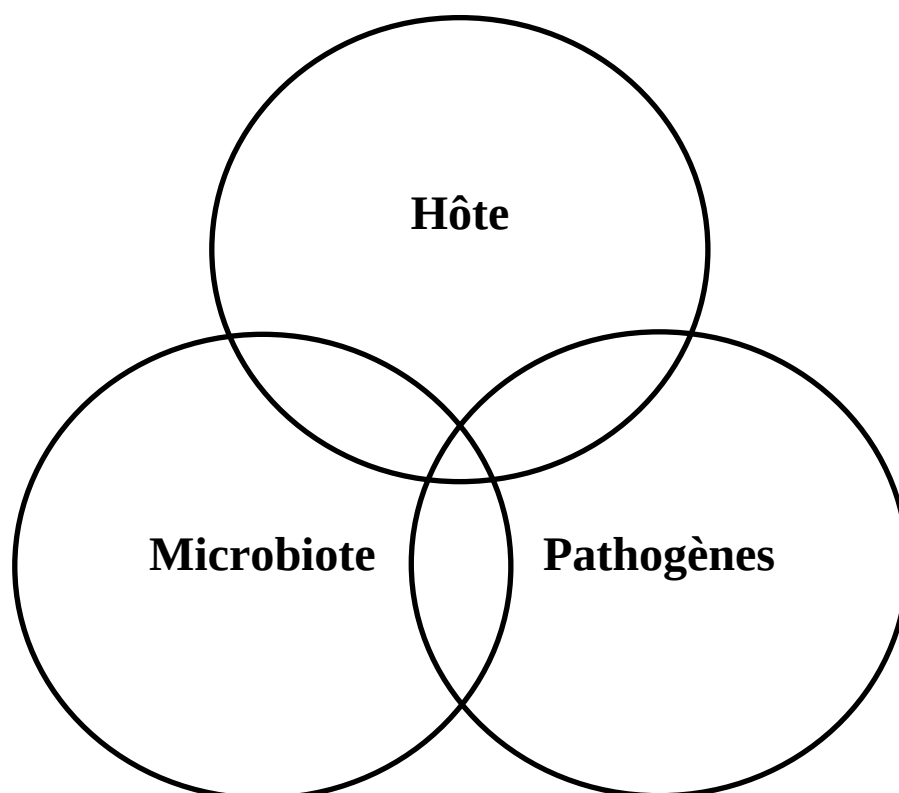
CHAPITRE IV

Inhibition de l'invasion de *S. aureus* par *L. casei*

Conditions inhibitrices

et

Mécanismes mis en jeu



S. aureus est un agent pathogène majeur responsable de mammites, notamment dans les troupeaux de vaches laitières (Akers et al., 2011). Un des facteurs contribuant à la chronicité des infections à *S. aureus*, comme nous l'avons décrit plus en détails précédemment, est sa capacité à envahir les tissus épithéliaux de l'hôte (Almeida et al., 1996 ; Sinha et al., 2010 ; 2012 ; Qazi et al., 2004). Dans le processus d'invasion, l'adhésion et l'internalisation bactériennes lui permettent à la fois d'échapper au système immunitaire de l'hôte mais aussi de résister à la plupart des agents antimicrobiens (Sinha et al., 2010 ; 2012). Lors de mammites d'origine infectieuse, le pathogène entre dans la glande mammaire via le canal du trayon. A ce niveau, en plus de la barrière physique et immunitaire, il a été mis en évidence l'existence d'un écosystème mammaire pouvant assurer un effet barrière vis-à-vis de l'implantation des agents pathogènes. Les travaux présentés au chapitre 2 renforcent cette idée puisque des bactéries lactiques isolées de l'écosystème mammaire bovin présentent un potentiel inhibiteur vis-à-vis des pathogènes impliqués dans les mammites bovines, soit par leurs propriétés agrégatives, soit par leurs propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales mammaires et donc leurs capacités à occuper l'écosystème.

Dans cette partie, nous avons souhaité explorer cette capacité des bactéries lactiques à être en compétition avec les pathogènes pour l'écosystème mammaire. Après l'interaction Hôte-Pathogène (chapitre 1) et l'interaction Hôte-Microbiote (chapitre 2), nous nous intéresserons dans ce chapitre à l'interaction tripartite Hôte- pathogène-microbiote. Nous avons mis en œuvre un modèle *in vitro* simplifié permettant d'aborder cette interaction tripartite, et impliquant la lignée des cellules épithéliales mammaires MAC-T, représentante de l'hôte bovin, *Staphylococcus aureus*, représentant notre modèle de pathogène, et *Lactobacillus casei*, représentant un membre de l'écosystème mammaire.

Avant de présenter ce travail, il convient de mieux présenter les 3 acteurs de cette interaction. La lignée cellulaire MAC-T est une lignée immortalisée par la transfection de cellules mammaires alvéolaires primaires et de « SV-40 large T-antigen ». Elle présente un temps de doublement de 17 h et peut produire de l' α -caséine, de la β -caséine et du lactose (Huynh et al., 1991). Elle a été largement utilisée pour des études portant sur l'interaction cellules épithéliales mammaires-pathogène (Alekseeva et al., 2013 ; Kerro-Dego et al., 2002/2011 ; Almeida et al., 1996). Concernant les souches de *S. aureus*, nous avons retenu les deux souches bovines RF122 et NB305 dont les caractéristiques sont largement décrites dans

le chapitre 2. Enfin, le choix concernant la bactérie lactique s'est porté sur *Lactobacillus casei*. La littérature scientifique montre notamment dans l'écoystème intestinal un effet protecteur de cette espèce. Nous avons retenu deux souches de *L. casei* (BL23 et ATCC 393) présentant des propriétés probiotiques avérées (Douillard et al., 2013 ; Le Blanc et al., 2011 ; Mazé et al., 2010 ; Munoz-Provencio et al., 2009). Il est utile de préciser également que des travaux antérieurs menés dans l'équipe ont montré que du surnageant de culture de *L. casei* ATCC 393 limite la formation de biofilm par *S. aureus* (données non publiées), la formation de biofilms étant également avancée pour expliquer la persistance des infections à *S. aureus*. Nous avons également introduit dans cette étude une souche de *L. casei* isolée de l'écosystème mammaire au cours de ce travail (Sidira et al., 2010 ; Eun et al., 2011 ; LeBlanc et al., 2011).

Une première étape du travail a consisté à identifier les conditions d'incubation permettant de mettre en évidence une inhibition de l'invasion de *S. aureus* par *L. casei*. Nous avons dans un deuxième temps recherché les mécanismes à l'origine de l'inhibition par *L. casei* de l'adhésion et de l'internalisation de *S. aureus* (RF122 et NB305) aux cellules MAC-T. Enfin, l'impact du traitement bactérien sur la morphologie et viabilité cellulaire a été évalué, l'innocuité d'une souche vis-à-vis des tissus étant un pré-requis pour une souche probiotique.

Dans ce modèle simplifié de pathosystème mammite, l'antagonisme des souches de *L. casei* vis-à-vis de l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* a été mis en évidence. Si dans les écosystèmes intestinal et vaginal, l'antagonisme des *Lactobacillus* contre les flores pathogènes est déjà bien documenté (Chan et al., 1985 ; Boris et al., 1998 ; Campana et al., 2012), cet antagonisme n'avait encore jamais été démontré dans le contexte de la glande mammaire et des mammites staphylococciques. Ce travail offre de nouvelles opportunités pour la réalisation d'un probiotique mammaire.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication scientifique acceptée en 2013 dans AEM (Bouchard et al., 2013). Suite à cette publication, nous avons poursuivi nos travaux sur l'identification des mécanismes impliqués et avons notamment testé l'implication d'une protéine de surface chez *L. casei*, la Fibronectine –binding protein, dans l'inhibition de l'internalisation par *S. aureus* (cf ci-dessous).

Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*

Running title: *S. aureus* invasion into bMEC impaired by *L. casei*

Damien S Bouchard^{1,2}, Lucie Rault^{1,2}, Nadia Berkova^{1,2}, Yves Le Loir^{1,2} and Sergine Even^{1,2, #}

¹INRA, UMR 1253 STLO, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France.

²Agrocampus Ouest, UMR1253 STLO, 85 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France

corresponding author

Tel.: +33 (0) 2 23 48 59 44

Fax: +33 (0) 2 23 48 53 50

E-mail: sergine.even@rennes.inra.fr

Correspondance address:

Sergine Even, UMR 1253 STLO, INRA-Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex, France

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, adhesion, internalization, mammary epithelial cells.

Abstract

Staphylococcus aureus is a major pathogen responsible for mastitis in dairy herds. *S. aureus* mastitis is difficult to treat and prone to recurrence despite antibiotic treatment. *S. aureus* ability to invade bovine mammary epithelial cells (bMEC) is evoked to explain this chronicity. One sustainable alternative to treat or prevent mastitis is the use of lactic acid bacteria (LAB) as mammary probiotics. In this study, we tested the ability of *Lactobacillus casei* strains to prevent invasion of bMEC by two *S. aureus* bovine strains, RF122 and Newbould305, which reproducibly induce acute and moderate mastitis, respectively. *L. casei* strains affected adhesion and/or internalization of *S. aureus* in a strain-dependent manner. Interestingly, *L. casei* CIRM-BIA 667 reduced *S. aureus* Newbould305 and RF122 internalization by 60 % to 80 %, and this inhibition was confirmed for two other *L. casei* strains, including one isolated from bovine teat canal. The protective effect occurred without affecting bMEC morphology and viability. Once internalized, the fate of *S. aureus* was not affected by *L. casei*. It should be noted that *L. casei* was internalized at a low rate but survived in bMEC cells with a better efficiency than that of *S. aureus* RF122. Inhibition of *S. aureus* adhesion was maintained with heat-killed *L. casei*, whereas contact between live *L. casei* and *S. aureus* or bMEC was required to prevent *S. aureus* internalization. This first study of the antagonism of LAB towards *S. aureus* in a mammary context opens avenues for the development of novel control strategies against this major pathogen.

Introduction

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen with a broad host range and is a leading cause of chronic and acute infections in humans and domesticated animals worldwide (Akers and Nickerson, 2011; Archer, 1998; Delgado et al., 2011; Zadoks et al., 2011). Among these infections, mastitis is a major disease affecting dairy herds and resulting in huge economic losses all along the milk production chain (Contreras and Rodriguez, 2011; Le Maréchal et al., 2011a; Steeneveld et al., 2011). In milk production, *Staphylococcus* species are the main contagious pathogens responsible for clinical and subclinical mastitis in lactating cows (Contreras and Rodriguez, 2011). *S. aureus* generally causes more acute infections than other staphylococcal species, which can be linked to its ability to colonize the host tissue and thus cause persisting and relapsing infections (Barlow, 2011).

To date, intramammary administration of antibiotics is the most common method to treat bovine mastitis (Barlow, 2011; Nickerson, 2009). However, antibiotic treatments have a low cure rate during lactation for many mastitis pathogens and especially for *S. aureus*, frequently resulting in chronic and recurrent infections. The mechanism of persistence of *S. aureus* in its host is still not fully understood. One confirmed mechanism used to evade host defenses is internalization into host cells. It is now well established that *S. aureus* can adhere to and internalize into mammary gland epithelial cells (Almeida et al., 1996). A gamut of surface-exposed (protein A, fibrinogen- and fibronectin-binding proteins) and secreted (enterotoxins, hemolysins and coagulase) virulence factors allows it to colonize, invade and multiply in host tissues (Almeida et al., 1996; Heilmann, 2011; Le Maréchal et al., 2011b; Qazi et al., 2004; Sinha and Fraunholz, 2010).

Many strategies have been proposed to counteract the infectious cycle of *S. aureus* within the mammary gland. Critical steps like adhesion and invasion of the host cells can be targeted by innovative strategies that take account of the increasing social demand for a sustainable agriculture with reduced inputs such as antibiotics. In recent years, the concept of biological control has emerged as one interesting sustainable alternative to fight against pathogens. The range of applications of probiotic bacteria has thus broadened and they are now considered as a possibility for alternative treatments against mastitis (Espeche et al., 2012; Redi, 2006). The inhibitory activities of lactic acid bacteria (LAB) with a GRAS (Generally Recognized As Safe) status against pathogens have been under scrutiny to address the problem of pathogen colonization in different ecosystems. Lactobacilli are known to have

a protective effect against some infections. This ability has been related to the adhesion properties of epithelial cells, which inhibit pathogen adhesion by specific competition or by steric hindrance, as well as to growth inhibition of pathogens by the secretion of bacteriocins, H₂O₂ or other antimicrobial compounds, and to competition for nutrients and to modulation of the host immune response (Reid and Burton, 2002). Such properties are harnessed in the development of vaginal probiotics used to prevent uro-genital infections (Reid, 2012). Recently, the use of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain was reported to be as efficient as a conventional antibiotic therapy to treat staphylococcal mastitis (Beecher et al., 2009; Klostermann et al., 2008). Encouraging results were also obtained with a *Lactobacillus perolens* strain which was able to inhibit several mastitis-causing pathogens *in vitro*, to co-aggregate with all of them and to adhere to bovine teat canal epithelial cells without affecting udder aspect or the appearance of milk (Frola et al., 2011). These alternative insights into intramammary infections provide new leads in the fight against mastitis.

In this work, we evaluated the ability of *Lactobacillus casei* to counteract *S. aureus* adhesion to and internalization into bMEC. *L. casei* CIRM-BIA 667 was selected for this study on the basis of (i) its probiotic effects in the intestinal ecosystem (Hsueh et al., 2010; Lazar et al., 2009), and (ii) its inhibitory activity against staphylococcal biofilm formation (personal observation). The main results were further confirmed on two additional strains, BL23 and CIRM-BIA 1542, a strain isolated from bovine teat canal.

Material and Methods

Bacterial strains and culture conditions

Two bovine strains of *Staphylococcus aureus* were used in this study: *S. aureus* RF122 (renamed ET-3 in Herron-Olson *et al.*, 2007) and *S. aureus* Newbould 305 (hereafter referred to as NB305). These strains are well-characterized and reproducibly induce severe or mild mastitis in experimental infections (Herron-Olson *et al.*, 2007; Newbould, 1974). The *Lactobacillus casei* strain, CIRM-BIA 667 (hereafter referred to as 667 and also known as CNRZ 313 and ATCC 393), was used to assess inhibitory capabilities against staphylococcal infection *in vitro*. It is the type strain for *L. casei*. Two additional *L. casei* strains were included: *L. casei* BL23, known for its probiotic properties (Foligne *et al.*, 2007; Rochat *et al.*, 2007) and *L. casei* CIRM-BIA 1542 (hereafter referred to as 1542), isolated from bovine teat canal (this study).

S. aureus strain RF122 carrying plasmid pCtuf-*gfp* (Biswas *et al.*, 2006) was constructed in this study to allow constitutive expression of Green Fluorescent Protein (GFP) in this strain and direct visualization of *S. aureus* adhered to or internalized into MAC-T cells by confocal microscopy (see below). Subcultures prior to invasion assays were performed overnight as follows: for *S. aureus* strains, culture was carried out in Brain Heart Infusion medium (BHI, pH 7.4, BD, Le Pont de Claix, France) at 37 °C under agitation (180 rpm), and *L. casei* was cultured in Man Rogosa Sharpe medium (MRS, pH 6.8, BD, Le Pont de Claix, France) at 30°C without shaking. Subcultures were washed once with PBS and suspended at different concentrations in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, pH 7.4, D. Dutscher, Brumath, France).

Bacterial concentrations in subcultures were estimated by spectrophotometric measurements at 600 nm with a VWR V-1200 spectrophotometer. They were further confirmed by determination of the bacterial population using a micromethod, as previously described (29). The *S. aureus* population (cfu/mL) was determined on Mannitol Salt Agar (MSA, D. Dutscher, Brumath, France) after 24 h of incubation at 37°C. the *L. casei* population was determined on MRS pH 5.4 and incubated anaerobically for 48 h at 37°C in an anaerobic jar.

Mammary epithelial cells and culture conditions

The established bovine mammary epithelial cell (MAC-T) line (Huynh *et al.*, 1991) (Nexia Biotechnologies, Quebec, Canada) has been widely used for invasion assays (Almeida *et al.*, 1996) and was thus retained for this study. MAC-T cells were cultured in T75 cell culture

flasks using MAC-T medium: DMEM containing 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin and 5 µg/mL insulin (D. Dutscher). Cells were incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5 % CO₂. They were cultured to a confluent monolayer, treated with 0.05 % trypsin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) and suspended in fresh MAC-T medium at a concentration of 2×10^5 cells/mL. For adhesion and internalization assays, cells were then seeded in 12-well plates (2×10^5 cells/well) and incubated overnight at 37°C in 5 % CO₂ to obtain a confluent monolayer.

Adhesion assays

Adhesion assays were adapted from Almeida *et al.* (Almeida et al., 1996) and modified as follows: confluent monolayers of MAC-T cells (2.5×10^5 cells/well) were washed twice with PBS and incubated at 37°C in 5 % CO₂ with 1 mL of *S. aureus* suspension in DMEM at 2.5×10^6 cfu/mL, 1×10^7 cfu/mL, or 2.5×10^7 cfu/mL to achieve a multiplicity of infection (MOI, *S. aureus*:cells) of 10:1, 40:1 or 100:1, respectively. Adhesion assays with *L. casei* were performed by adding 1 mL of *L. casei* at $1 \cdot 10^8$ cfu/mL or $5 \cdot 10^8$ cfu/mL to achieve a ratio of interaction (ROI, *L. casei*:cells) of 400:1 or 2000:1. *S. aureus* and *L. casei* adhesion was measured 1 h post-infection.

For adhesion inhibition assays, cells were primarily incubated with *L. casei* at a ROI of 200:1, 400:1 or 2000:1 for 2 h at 37°C with 5 % CO₂ and washed twice with PBS prior to infection with *S. aureus* for 1 h. When specified, *L. casei* suspension was separated from the cell monolayer using a 0.4-µm cell culture insert filter (Millicell, Millipore Corporation, Switzerland). After incubation steps, MAC-T monolayers were washed four times with PBS and treated by 0.05 % trypsin for 10 min at 37°C. Cells were centrifuged for 5 min at 800 g, and lysed using 100 µL of 0.01 % Triton in sterile water. The population of *S. aureus* that adhered (cfu/mL) was determined using a micromethod, as described above.

The adhesion assay of *S. aureus* alone was used as a reference. Adhesion rates were then defined as the adhered *S. aureus* population in the presence of *L. casei*, relative to the adhered *S. aureus* population in the reference experiment.

For some experiments, heat-killed *L. casei* 667 cells were prepared by incubating the *L. casei* suspension in DMEM at 95°C for 15 minutes prior to addition to bMEC. Supernatant samples were prepared from a 2-hour culture on DMEM of *L. casei* 667 inoculated at 5×10^8 cfu/mL and pH was adjusted to 7.4.

Internalization assays

Internalization assays were adapted from Almeida *et al.* (Almeida *et al.*, 1996) and modified as follows: Confluent monolayers of MAC-T cells (2.5×10^5 cells/well) were washed twice with PBS and incubated at 37°C in 5 % CO₂ with 1 mL of *S. aureus* and or *L. casei* suspension in DMEM at a MOI of 10:1, 40:1 or 100:1 for *S. aureus* and a ROI of 200:1, 400:1 or 2000:1 for *L. casei*. *S. aureus* and *L. casei* internalizations were measured 2 h post-infection. For internalization inhibition assays, *L. casei* and *S. aureus* were simultaneously added to the cells for 2 h. When specified, *L. casei* was separated from the cell monolayer and *S. aureus* using a 0.4-µm cell culture insert filter (Millicell, Millipore Corporation, Switzerland). *S. aureus* internalization was measured 2 h post-infection following an additional 2-h incubation step with DMEM supplemented with gentamicin (100 µg/mL). This step resulted in the killing of extracellular bacteria and allowed the numeration of the internalized bacterial population only. Subsequently, MAC-T monolayers were washed four times with PBS, treated by trypsin, centrifuged for 5 min at 800 g, and lysed in 0.01 % Triton. *S. aureus* and *L. casei* populations were determined as described above.

The internalization assay of *S. aureus* alone was used as a reference. Internalization rates were then defined as the internalized *S. aureus* population in the presence of *L. casei*, relative to the internalized *S. aureus* population in the reference experiment. Heat-killed *L. casei* 667 and supernatant of *L. casei* 667 cells were prepared as described above.

Intracellular survival assays

Internalization assays were performed as described above with *S. aureus* RF122 at a MOI of 10:1, 40:1 or 100:1 and in the presence or not of *L. casei* 667 (ROI of 2000:1). The internalized *S. aureus* population measured after these two hours of infection was used as the starting point for intracellular survival assay. Cells were further incubated in DMEM containing gentamicin (25 µg/mL) at 37°C in 5 % CO₂ and the remaining internalized *S. aureus* population was measured 24 h, 48 h and 72 h post-infection. DMEM-gentamicin medium was changed every 24 h.

Cell counting and cell viability assays

Cell density and viability were determined using a hemocytometer by the trypan blue exclusion method 2 h, 24 h, 48 h and 72 h post-infection.

MTT cell viability assays

Cell viability was measured during the intracellular survival assay (see above) at 2 h, 24 h, 48 h and 72 h post-infection using methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT), as previously described (Maudsdotter et al., 2011). Briefly, following incubation with DMEM containing 25 µg/mL gentamycin, cells were washed four times and incubated in 0.5 mg/mL MTT in PBS for 4

h at 37°C in 5 % CO₂. The medium was removed and isopropanol was added for 30 minutes with shaking at 350 rpm. Absorbance was read at 570 nm with a background at 690 nm. Uninfected cells were used as a negative control (100 % viability) and cells treated with 0.01% Triton served as a positive control of mortality (0 % viability). Relative viability was expressed with regard to uninfected cells.

Analysis of cellular morphology during internalization assay by confocal microscopy

MAC-T cells were cultured in 8-well LabtekTM chamber slides (NalgeNunc International, Naperville, IL, USA). A total of 5×10^4 cells were seeded in each well and incubated overnight at 37°C with 5 % CO₂. Internalization assays were performed as described above, including a 2-h step with gentamicin (100 µg/mL) to kill extracellular bacteria, with a MOI of 100:1 for *S. aureus* RF122 and a ROI of 2000:1 for *L. casei* 667. Following the internalization assay, cells were washed four times with PBS, fixed for 30 min in PBS containing 4 % paraformaldehyde and permeabilized with PBS containing 0.1 % saponin for 10 min. Staining was performed in darkness at room temperature. Cells were stained using the fluorescent nucleic acid stain SYTO9 from the LIVE/DEAD BacLight stain kit (Molecular Probes Inc., Leiden, The Netherlands) for 30 min, which allowed staining of both bacteria and MAC-T cells. Alternatively, the *S. aureus* strain RF122 carrying plasmid pCtuf-*gfp* was used and combined with the staining of cell actin cytoskeleton with phalloidin (Interchim, Montluçon, France) at 1 U/mL in PBS containing 1 % bovine serum albumin for 30 min. This allowed visualization of *S. aureus* (green) and cytoskeleton (red). Images were acquired using the confocal Nikon C1Si microscope (NIKON, Tokyo, Japan) with an excitation wavelength of 488 (for SYTO9 and GFP) and of 543 nm (for phalloidin) and using a lens with a 100x magnification. Emission of fluorescence was followed at 515 nm (± 15 nm) for SYTO 9 and GFP and 590 nm for phalloidin. Image analysis was performed with Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S.

National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011).

Statistical analysis

Each experiment was done in triplicate (biological repeats). Statistical analysis was performed with R software (R Development Core Team, 2007). The differences among the groups were assessed using Student's t test with Bonferroni's correction considering a P-value lower than 0.05.

Results

Adhesion and internalization capacities of *S. aureus* and *L. casei*

We tested *in vitro* the adhesion and internalization abilities of two *S. aureus* bovine strains, namely RF122 and NB305, which induce severe and mild bovine mastitis, respectively. Interestingly, we found that the adhesion and internalization capacities of NB305 were higher than that of RF122. Adhered and internalized *S. aureus* populations were 5-fold and 40-fold higher, respectively, for strain NB305 than for RF122 at a MOI of 100:1 (Fig. 1). As a comparison, adhesion and internalization capacities of *L. casei* were also assessed. The three *L. casei* strains used exhibited poor adhesion capacities compared to *S. aureus*, as illustrated on Fig. 1. Indeed, despite a higher bacteria:cell ratio (2000:1 and 100:1 for *L. casei* and *S. aureus*, respectively), the adhered and internalized populations were lower for *L. casei* than for *S. aureus*.

***L. casei* 667 reduced the adhesion of *S. aureus* RF122**

Several conditions of adhesion were tested to evaluate the capacities of *L. casei* to prevent adhesion of *S. aureus* RF122 and NB305 to bMEC: preincubation of bMEC with *L. casei* prior to infection by *S. aureus* or coinfection of both species. Three MOI were tested for *S. aureus* in combination with three ROI for *L. casei* 667. Conditions leading to *L. casei*-mediated inhibition were preincubation of MAC-T cells for 2 h with *L. casei* at a ROI of 200:1, 400:1 or 2000:1, followed by the addition of *S. aureus* at a MOI of 100:1. Under these conditions, a significant reduction of the adhesion rate was observed for *S. aureus* RF122, down to ~60 % of the adhesion observed with *S. aureus* RF122 alone (Fig. 2). It should be noted that during this experiment and subsequent assays of adhesion and internalization, the density of the MAC-T cell monolayer was conserved, as confirmed by direct microscopic observation and cell counting. Thus, the lower adhered population of *S. aureus* RF122 to MAC-T cells did not result from a lower amount of attached MAC-T cells in wells when incubated with *L. casei*. Under the same experimental conditions, *L. casei* 667 did not significantly affect the adhesion rate of *S. aureus* NB305 (Fig. 2). Similarly, no significant inhibition of *S. aureus* RF122 or NB305 was observed with the two additional *L. casei* strains tested, BL23 and 1542 (Fig. 4A). This result indicates that the inhibitory efficacy of *L. casei* depends both on the *S. aureus* and *L. casei* strains used.

***L. casei* reduced internalization of *S. aureus* RF122 and NB305**

Beyond the *L. casei* ability to impair *S. aureus* adhesion, we tested its inhibitory potential against *S. aureus* RF122 and NB305 internalization into MAC-T cells. As mentioned for adhesion assays, several conditions were tested. Conditions resulting in *L. casei*-mediated inhibition were the coincubation of *L. casei* at a ROI of 2000:1 with *S. aureus* at a MOI of 10:1, 40:1 or 100:1. Under these conditions, coinfection of *S. aureus* RF122 or NB305 with *L. casei* led to a significant decrease of their internalization rates by 61-75% (Fig. 3). This result was further confirmed with the two additional *L. casei* strains (Fig. 4B). Of note, due to the strong acidification of the medium by mixed culture of *L. casei* 1542 and *S. aureus*, the ROI was only 400:1 in mixed cultures for this *L. casei* strain, compared to a ROI of 2000:1 for strains 667 and BL23. Despite this lower ROI, *L. casei* 1542 efficiently inhibited *S. aureus* internalization. It should be observed here that the total number of viable staphylococci was unaffected by the presence of *L. casei* in adhesion or internalization assays. *S. aureus* was indeed able to grow in DMEM during incubation with bMEC and the population reached after one or two hours of infection was similar with or without preincubation or coinfection with *L. casei* (Fig. S1). Interestingly, inhibition of internalization was reciprocal. Hence, the rate of *L. casei* 667 internalization was reduced by 58 % and 50 % in coinfection experiments with *S. aureus* RF122 and NB305, respectively.

***L. casei* 667 did not alter intracellular survival of *S. aureus* RF122**

To investigate the fate of internalized bacteria, intracellular survival of *S. aureus* RF122 was followed 24 h, 48 h and 72 h post-infection. A rapid decrease of the *S. aureus* internalized population was observed with only 6 % and 0.26 % of the initial internalized *S. aureus* population after 24 h and 48 h of infection (Fig. 5). The *S. aureus* internalized population was lower in the presence of *L. casei* but a similar decrease of the *S. aureus* internalized population was observed, as illustrated by half-lives of internalized *S. aureus* into MAC-T of 6.1 h and 5.1 h with and without *L. casei*, respectively ($p=0.12$). This result was confirmed with *S. aureus* MOI of 40:1 and 10:1 (data not shown). Intracellular survival of *L. casei* was greater than that of *S. aureus* RF122, as illustrated by a lower rate of decrease of the *L. casei* population ($p=0.002$) (Fig. 5).

***L. casei* 667 treatment did not affect MAC-T cell viability**

We showed that *L. casei* was able to inhibit *S. aureus* invasion into MAC-T cells without affecting the cell monolayer density. Additional studies were done to investigate the effect of *L. casei* 667 on cell viability and morphology. Cell viability was estimated by trypan blue exclusion and indicated that viability was above 99 % for all of the bacterial concentrations tested (data not shown). In agreement, cell viability assessed by MTT assays revealed the same decrease of viability for infected and uninfected cells, i.e., a drop in cell viability of 20-25 % from 48 h onwards (Fig. S2). Finally, direct observation of bMEC by confocal microscopy during internalization assays confirmed that the general cell architecture was similar in untreated control cells and cells treated with *L. casei* or *S. aureus* RF122 either alone or in combination (Fig. 6).

Inhibition of internalization required live *L. casei*, whereas adhesion did not

To further characterize the inhibition observed with *L. casei*, additional adhesion and internalization experiments were carried out by replacing *L. casei* with either (i) DMEM medium artificially acidified to pH 6.8 with lactic acid (corresponding to the pH reached after two hours of incubation of MAC-T cells with *L. casei* at a ROI of 2000:1), (ii) supernatant of *L. casei* grown in DMEM, or (iii) heat-killed *L. casei*. Neither DMEM containing lactic acid nor *L. casei* supernatant affected *S. aureus* RF122 adhesion or internalization rates (Fig. 7). Heat-killed *L. casei* was still able to inhibit *S. aureus* RF122 adhesion, whereas the inhibitory effect of *L. casei* on *S. aureus* internalization occurred only in the presence of live *L. casei* (Fig. 7). Surprisingly, heat-killed *L. casei* even seemed to favor *S. aureus* internalization, although the difference was not statistically significant ($p=0.13$).

Inhibition of adhesion and internalization required contact with *L. casei*

To further characterize the mechanism of inhibition, additional adhesion and internalization experiments were carried out using cell culture insert filter in order to separate *L. casei* from bMEC and *S. aureus*. *L. casei*-mediated inhibition of adhesion was released when *L. casei* was separated from bMEC during the preincubation step (Fig. 8A). Likewise, *L. casei*-mediated inhibition of internalization was not retained using cell culture insert filter, indicating that the contact of live *L. casei* with bMEC and or *S. aureus* was required (Fig. 8B).

Discussion

In this work, we established the ability of *L. casei* to reduce adhesion to and/or internalization into MAC-T cells of two bovine *S. aureus* strains. The ability of *L. casei* to affect adhesion was strain-dependent. *L. casei* 667 was the only *L. casei* strain able to inhibit adhesion of *S. aureus* RF122 by 40 %. This was not confirmed on the highly adherent *S. aureus* strain NB305, indicating that *L. casei* 667 inhibition of *S. aureus* adhesion to bMEC was restricted to the *S. aureus* strain with low adhesion capacity (i.e., RF122). The poor capacity of *L. casei* to inhibit *S. aureus* adhesion is probably related to its low adhesion capacity compared to *S. aureus*. Rates of adhesion to MAC-T cells were 4- to 30-fold lower for *L. casei* compared to *S. aureus*, although the bacteria:bMEC ratio was 20-fold higher. Such low adherence properties of *L. casei* 667 to epithelial cells had been previously reported (Hsueh et al., 2010). More striking in this work was the ability of *L. casei* to impair *S. aureus* internalization. As of this time, very few studies have investigated the ability of probiotic lactic acid bacteria to modulate internalization of pathogens within host cells (Campana et al., 2012). One interesting outcome was the inhibition of internalization of the two *S. aureus* strains tested by the three *L. casei* strains tested, whereas inhibition of *S. aureus* adhesion to bMEC was limited to one *S. aureus*/*L. casei* couple. Following internalization, the *S. aureus* bacterial population decreased. This was in agreement with a study by Martinez-Pulgarin *et al.* who reported that after a short period of intracellular replication (2 h), internalized *S. aureus* concentration into MAC-T gradually decreased over time (Martinez-Pulgarin et al., 2009). In fact, the fate of internalized *S. aureus* was similar with or without *L. casei*, suggesting that *L. casei* did not affect *S. aureus* physiology once internalized.

During these internalization assays, we also established the capacity of *L. casei* to internalize, and this was strongly strain-dependent. Interestingly, *L. casei* 1542, isolated from the teat canal, internalized more efficiently into bMEC cells. This might somehow reflect an adaptation of some *L. casei* strains to the bovine host, as previously shown for *S. aureus* ruminant isolates (Ben Zakour et al., 2008; Alves et al., 2009; Guinane et al., 2010). The internalization capacity of the three *L. casei* strains was lower than that of *S. aureus* NB305, and to a lesser extent, *S. aureus* RF122. Contrary to the adhesion capacity of LAB, which is well documented, only few studies report the internalization of lactic acid bacteria (Guimarazs et al., 2006). A fibronectin-binding protein has been identified in the genomes of *Lactobacillus* species, suggesting a capacity to adhere and to be internalized (Castaldo et al.,

2009; Hynonen et al., 2002; Lorca et al., 2002; Munoz-Provencio et al., 2010). Interestingly, the survival rate of *L. casei* in MAC-T cells was better than that of *S. aureus*. This improved survival may be due to a better resistance to acid and oxidative stresses (De Angelis and Gobetti, 2004).

L. casei inhibition of *S. aureus* adhesion and internalization required specific conditions. Two features were common to adhesion- and internalization-inhibition: (i) in all cases, post-treatment of *S. aureus*-adhered or internalized bMEC by *L. casei* did not alter *S. aureus* adhesion or internalization rates (data not shown), implying that the use of *L. casei* could thus be indicated for prevention rather than for treatment of *S. aureus* mastitis; and (ii) in all cases, contact with *L. casei* cells was required, indicating that inhibition did not rely on diffusible compounds. However, other features differed between adhesion- and internalization-inhibition. Inhibition of *S. aureus* RF122 adhesion required pre-incubation with *L. casei*, whereas inhibition of internalization occurred only when *S. aureus* was coincubated with *L. casei*. In addition, live *L. casei* was required to inhibit internalization, whereas heat-killed *L. casei* was still able to affect *S. aureus* adhesion. This suggests that the mechanisms of adhesion- and internalization-inhibition involve two distinct processes.

The results of adhesion inhibition are in agreement with a competitive exclusion mechanism. Preincubation of MAC-T cells with live or heat-killed *L. casei* allowed saturation of adhesion sites prior to inoculation by *S. aureus*. This is consistent with other studies where a similar decrease in the *S. aureus* adhesion rate (approximately 40 %) was observed by competition with viable or heat-killed *Lactobacillus* strains (Boris et al., 1998; Chan et al., 1985; Ren et al., 2012; Vesterlund et al., 2006).

L. casei inhibition of *S. aureus* internalization probably involves one or more means acting alone or in combination: (i) modulation of bMEC physiology or integrity induced by contact; (ii) direct effect on *S. aureus*, including coaggregation as observed for vaginal lactobacilli (Kmet and Lucchini, 1987; Younes et al., 2012), although preliminary experiments indicated that *L. casei* 667 exhibited poor aggregative abilities (data not shown); (iii) inhibition of *S. aureus* virulence expression, including major virulence regulators, as previously reported (Younes et al., 2012; Cretenet et al., 2010; Even et al., 2009; Li et al., 2011), and (iv) competition for attachment sites involved in internalization. In agreement with a competition mechanism, the *L. casei* internalization rate was also affected by *S. aureus*. To our

knowledge, this is the first time such reciprocal competition for internalization has been demonstrated.

In conclusion, the basic requirements for a strain to be used as a probiotic against epithelial cell infection are that it must be able to adhere to the host epithelium, have no cytotoxic effect on host cells, and show antagonistic activity towards pathogenic bacteria (Reid, 1999, 2006; Reid and Burton, 2002). In this study, we showed that *L. casei* meets all these criteria. *L. casei* was able to adhere to and even to internalize into MAC-T cells and to prevent *S. aureus* internalization and, to a lesser extent, adhesion, without modifying the cell viability and morphology. The use of LAB to prevent *S. aureus* invasion into bMEC leads to interesting perspectives on new topical strategies to improve the efficiency of mastitis treatment and to reduce the chronicity of *S. aureus* infection.

Acknowledgments

The authors are grateful to Marie-Noëlle Madec for her help and technical assistance during this work. We thank Gwenaél Jan for his critical reading of the manuscript. *L. casei* CIRM-BIA 667 was kindly provided by the Centre International de Ressources Microbiennes — Bactéries d'Intérêt Alimentaire, INRA, Rennes, France. Damien Bouchard is a recipient of a PhD fellowship from the French Ministry of Research. This work was financially supported by the French National Research Agency (ANR) project, NABAB (ANR-08-ALIA-11).

Figure legends

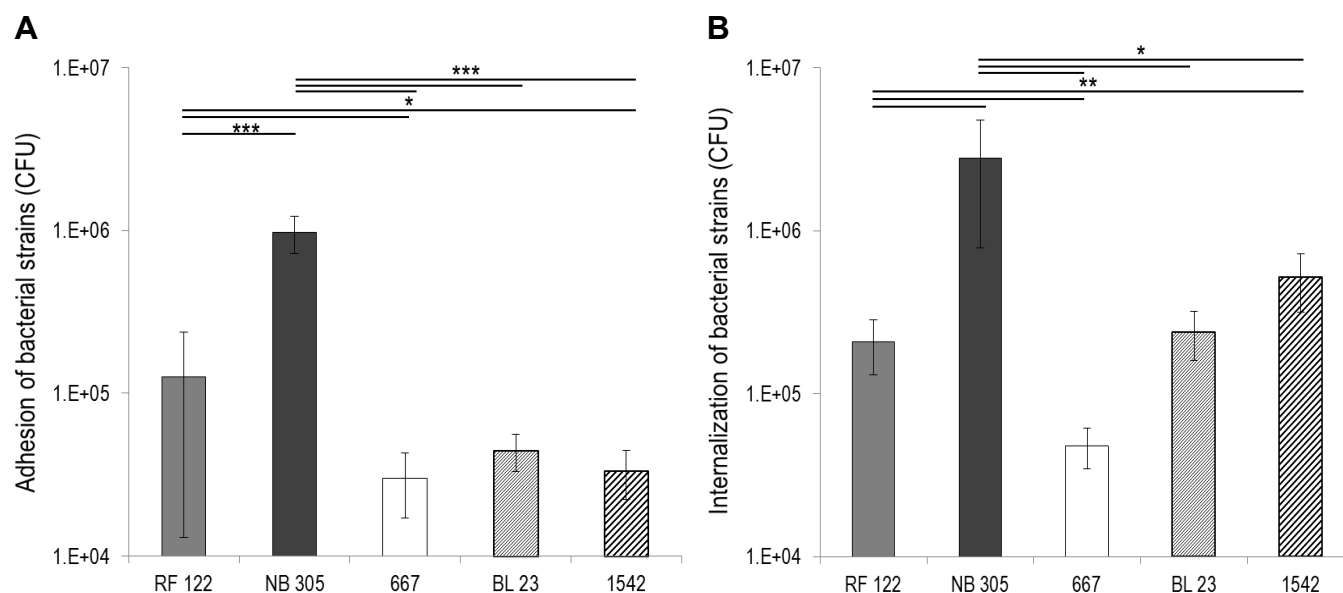


FIG 1 Adhesion to and internalization into bMEC of *S. aureus* strains RF122 and NB305 and *L. casei* strains CIRM-BIA 667, BL23 and CIRM-BIA 1542.

S. aureus (MOI of 100:1) and *L. casei* (ROI of 2000:1) populations adhered to (A) and internalized into (B) bMEC were determined after 1 h and 2 h of interaction, respectively. Data are presented as mean population per well (i.e., corresponding to $2.5 \cdot 10^5$ bMEC) $\pm$ Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between groups were compared using Student's t test. (*) $p < 0.05$ /(***) $p < 0.0005$

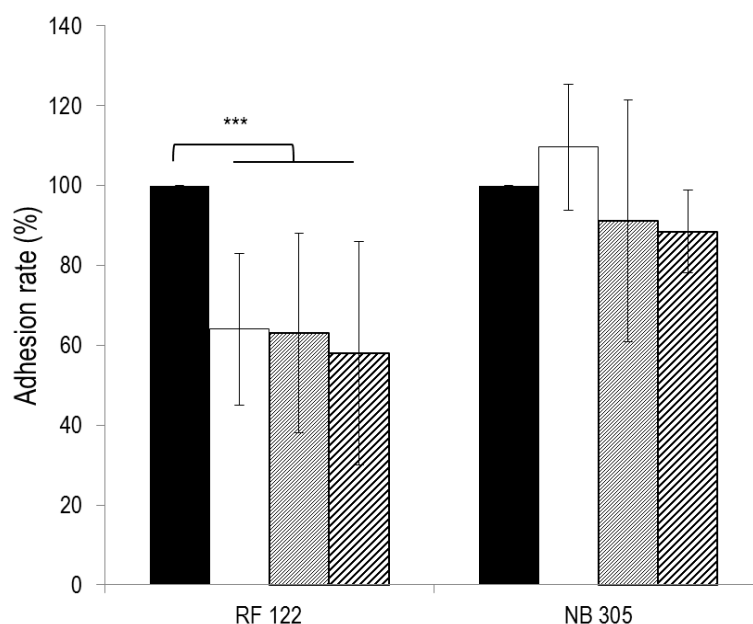


FIG 2 Inhibition of *S. aureus* RF122 and NB305 adhesion to bMEC by *L. casei* CIRM-BIA 667.

Adhesion rates of *S. aureus* strains after 1 h of interaction with bMEC, following 2 h of preincubation of cells with *L. casei* at a ROI of 200:1 (white bars), 400:1 (gray bars) and 2000:1 (hatched bars). *S. aureus* was used at a MOI of 100:1. Adhesion assay of *S. aureus* alone was used as a reference (black bars). Adhesion rates were then defined as the adhered *S. aureus* population in the presence of *L. casei*, relative to the adhered *S. aureus* population in the reference experiment. Data are presented as mean $\pm$ Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between groups were compared using Student's t test with Bonferroni's correction. (***) $p < 0.0005$.

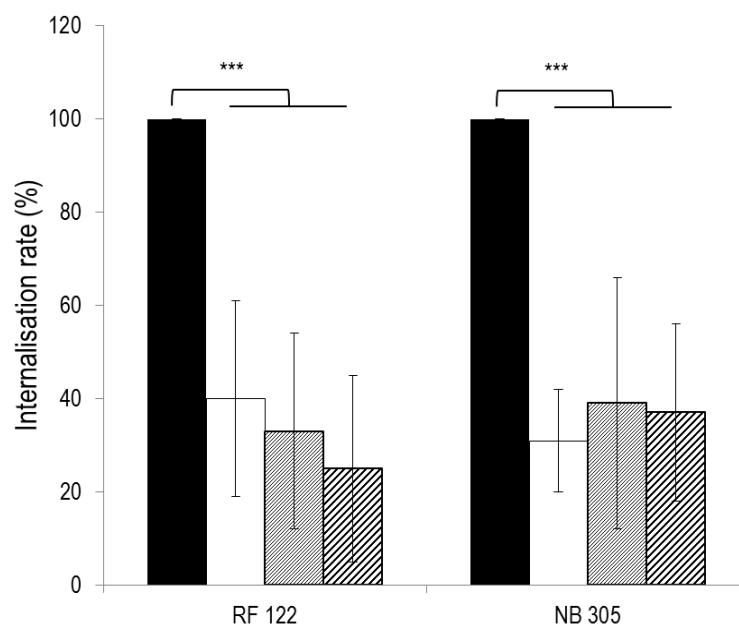


FIG 3 Inhibition of *S. aureus* RF122 and NB305 internalization into bMEC by *L. casei* CIRM-BIA 667.

Internalization rates of *S. aureus* strains after 2 h of interaction with bMEC with coincubation with *L. casei* at a ROI of 2000:1. *S. aureus* strains were used at a MOI of 10:1 (white bars), 40:1 (gray bars) or 100:1 (hatched bars). The internalization assay of *S. aureus* alone was used as a reference (black bars). Internalization rates were then defined as the internalized *S. aureus* population in the presence of *L. casei*, relative to the internalized *S. aureus* population in the reference experiment. Data are presented as mean +/- Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between groups were compared using Student's t test with Bonferroni's correction. (***) $p < 0.0005$.

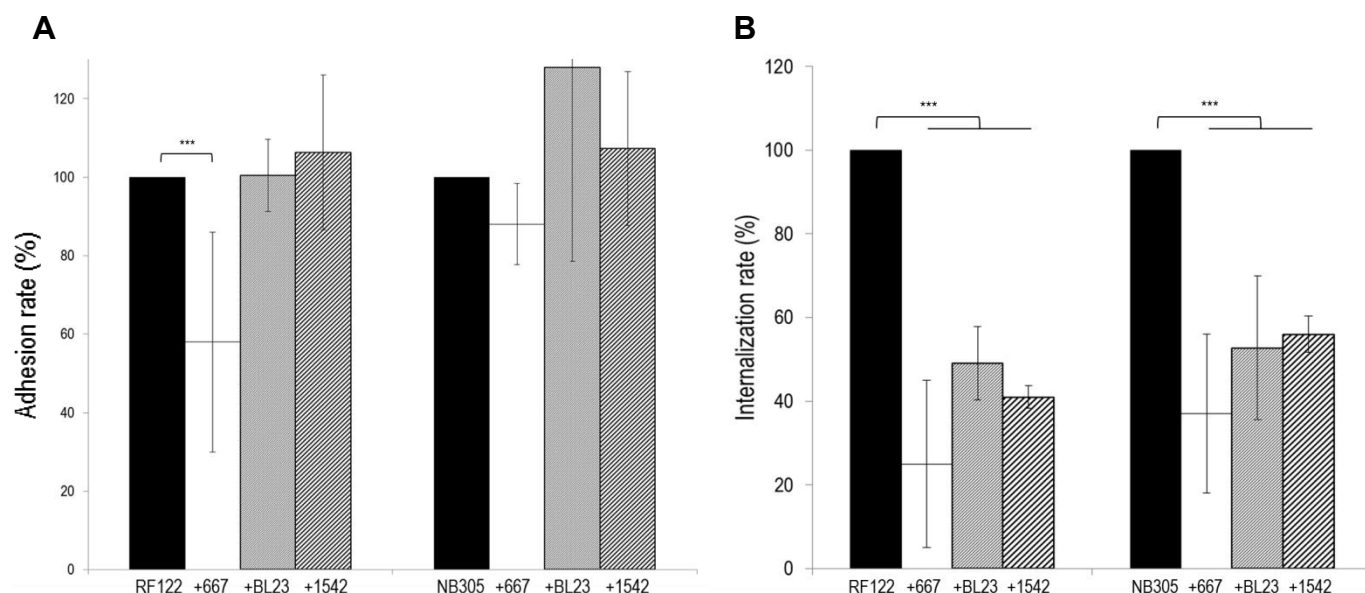


FIG 4 Inhibition of adhesion and internalization of *S. aureus* RF122 and NB305 by *L. casei* strains.

A: rates of adhesion of *S. aureus* RF122 and NB305 strains to bMEC, following preincubation of cells with *L. casei* CIRM-BIA 667 (white bars), BL23 (gray bars) and CIRM-BIA 1542 (hatched bars) at a ROI of 2000:1.

B: rates of internalization of *S. aureus* RF122 and NB305 into bMEC in the presence of *L. casei* CIRM-BIA 667 (white bars) and BL23 (gray bars) at a ROI of 2000:1 and CIRM-BIA 1542 (hatched bars) at a ROI of 400:1.

Adhesion and internalization assays were performed with an *S. aureus* MOI of 100:1. Adhesion/internalization assays of *S. aureus* alone were used as a reference (black bars). Adhesion/internalization rates were then defined as the adhered/internalized *S. aureus* population in the presence of *L. casei*, relative to the adhered/internalized *S. aureus* population in the reference experiment.

Data are presented as mean $\pm$ Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between groups were compared using Student's t test with Bonferroni's correction. (***) $p < 0.0005$.

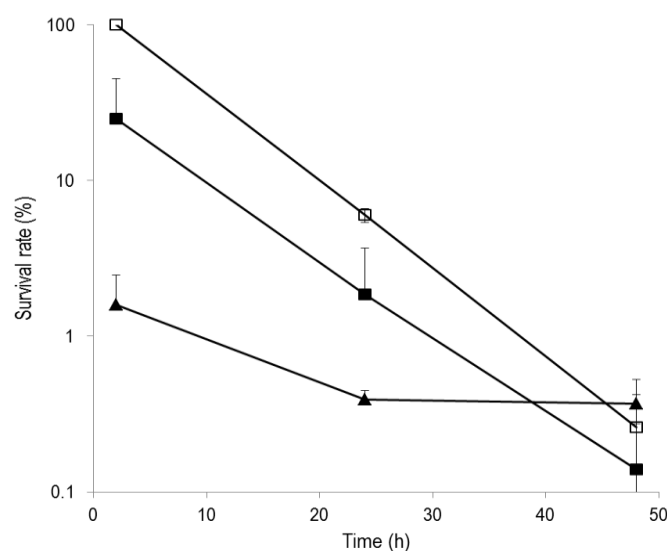


FIG 5 Survival rate of *S. aureus* RF122 and *L. casei* CIRM-BIA 667 within bMEC.

bMEC were incubated for 2 h with *S. aureus* RF122 (MOI 100:1) with or without *L. casei* CIRM-BIA 667 (ROI 2000:1) in DMEM. Following a 2-h incubation step with gentamicin (100 µg/mL) to kill extracellular bacteria, cells were further incubated with gentamicin (25 µg/mL) for 24 h and 48 h. The initial internalized *S. aureus* population measured after the 2 hours of infection by *S. aureus* alone was used as reference. The remaining internalized population of *S. aureus* alone (□) or in coinfection with *L. casei* (■) and *L. casei* (▲) were then measured and expressed relative to an *S. aureus* reference population. Data are presented as mean survival rate +/- Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between half-lives were compared using Student's t test.

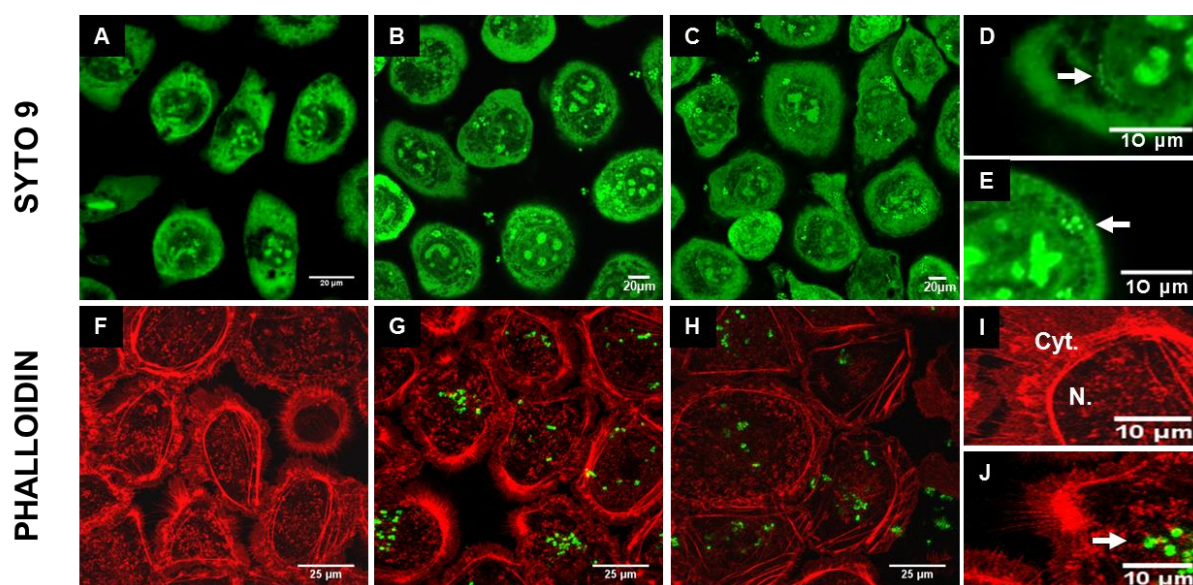


FIG 6 Fluorescent confocal microscopy of mammary epithelial cells during bacterial infections.

SYTO 9 (A – E) and phalloidin (F – J) stainings were used to observe bMEC structure following internalization assays with *S. aureus* RF122 (carrying plasmid pCtuf-*gfp* in the case of phalloidin staining) at a MOI of 100:1. MAC-T cells were either non-treated (control; panels A, F, I) or treated with *S. aureus* alone (panel B, E, G, J), *L. casei* CIRM-BIA 667 alone at a MOI of 2000:1 (panel D) or *S. aureus* and *L. casei* in cocultures (panels C, H). A lens with a 100x magnification was used, and panels D–E and I–J are electronically zoomed. Arrows indicate internalized *L. casei* (panel D) or internalized *S. aureus* (panels E, J).

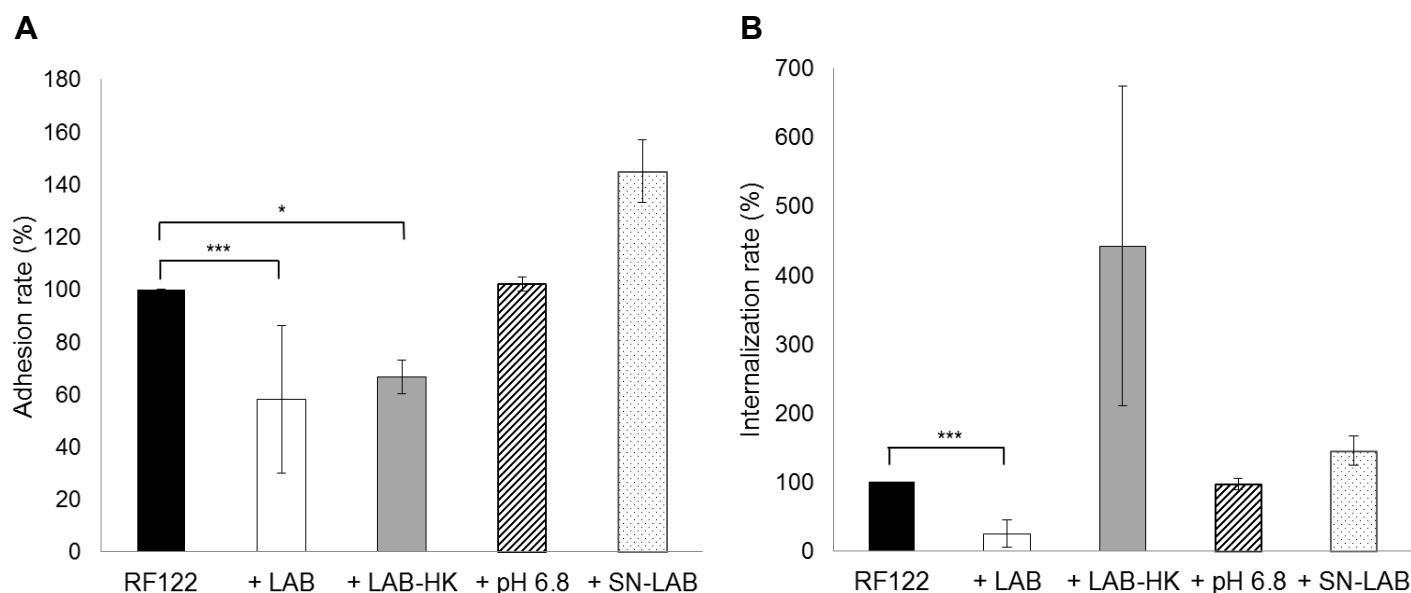


FIG 7 Adhesion and internalization rates of *S. aureus* RF122 with different treatments.

Panel A represents adhesion rates of *S. aureus* RF122 to bMEC at a MOI of 100:1, either alone or with preincubation of cells with *L. casei* CIRM-BIA 667 at a ROI of 2000:1 (+LAB), heat-killed *L. casei* CIRM-BIA 667 at a ROI of 2000:1 (+LAB-HK), DMEM acidified to pH 6.8 with lactic acid (+ pH 6.8) or *L. casei* CIRM-BIA 667 supernatant (+ SN-LAB).

Panel B represents internalization rates of *S. aureus* RF122 into bMEC at a MOI of 100:1, either alone or with coincubation with *L. casei* CIRM-BIA 667 at a ROI of 2000:1 (+LAB), heat-killed *L. casei* CIRM-BIA 667 at a ROI of 2000:1 (+LAB-HK), DMEM acidified to pH 6.8 with lactic acid (+ pH 6.8) or *L. casei* CIRM-BIA 667 supernatant (+ SN-LAB).

Adhesion/internalization assays of *S. aureus* alone were used as references. Adhesion/internalization rates were then defined as the adhered/internalized *S. aureus* population in the presence of *L. casei*, lactic acid or supernatant relative to the adhered/internalized *S. aureus* population in the reference experiment.

Data are presented as mean +/- Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between groups were compared using Student's t test with Bonferroni's correction. (*) $p < 0.05$ / (***) $p < 0.0005$.

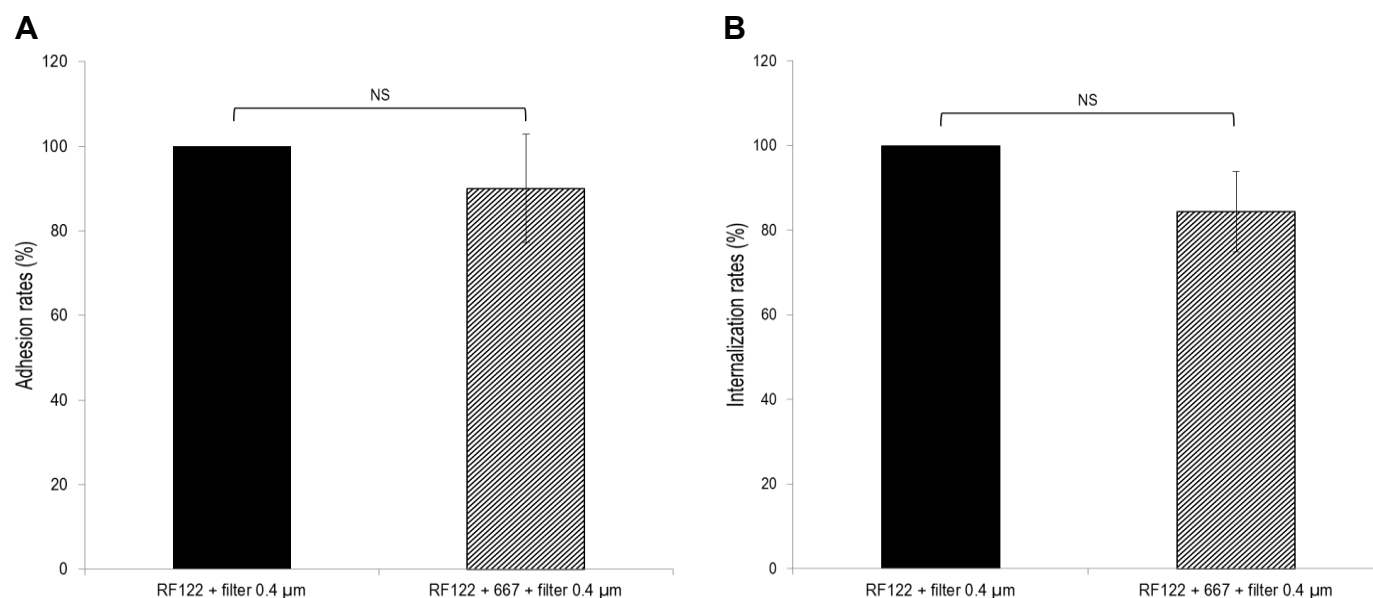


FIG 8 *L. casei* inhibition of *S. aureus* adhesion and internalization requires contact with bMEC and or *S. aureus*.

Adhesion and internalization assays were performed as previously described (see captions, Figs. 2 and 3), using *S. aureus* RF122 at a MOI of 100:1 and *L. casei* CIRM-BIA 667 at a ROI of 2000:1 except that *L. casei* was separated from *S. aureus* and bMEC using a cell culture insert.

Adhesion/internalization assays of *S. aureus* alone with the cell culture insert were used as references. Adhesion/internalization rates were then defined as the adhered/internalized *S. aureus* population in the presence of *L. casei*, relative to the adhered/internalized *S. aureus* population in the reference experiment.

Data are presented as mean +/- Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between groups were compared using Student's t test. (NS: not significant).

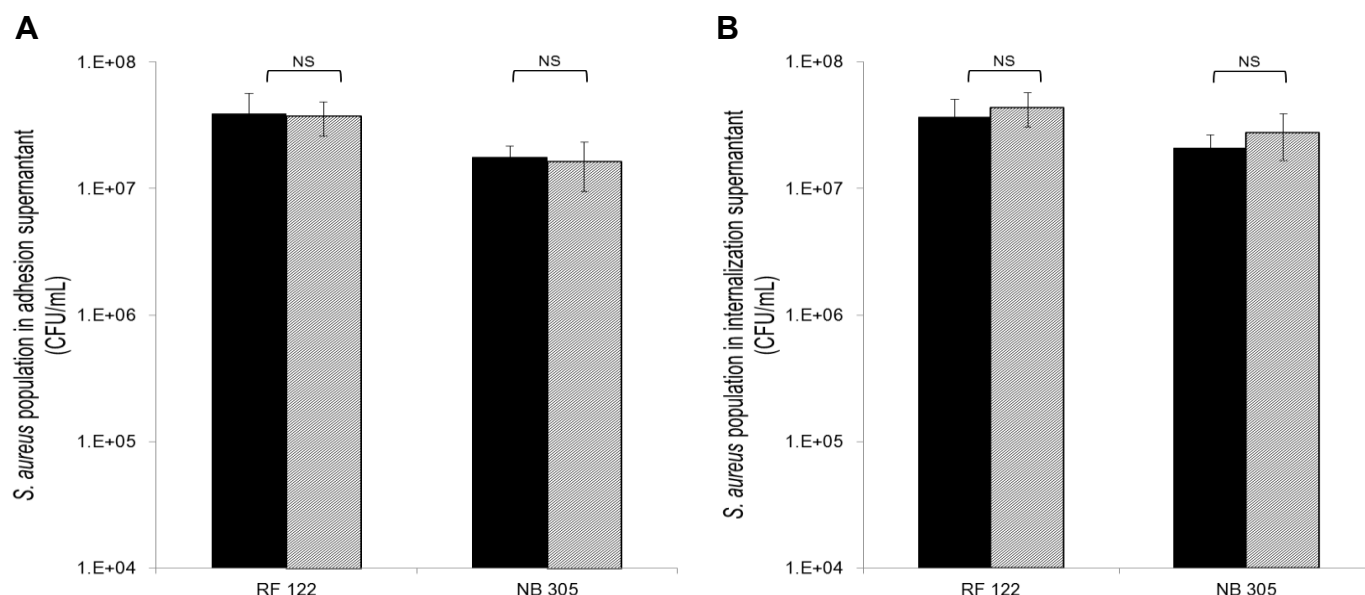


FIG S1 *S. aureus* RF122 and NB305 populations in supernatant during adhesion and internalization assays.

A: *S. aureus* RF122 and NB305 populations in adhesion assay supernatants after 1 h of infection at a MOI of 100:1, either alone (black bars) or following preincubation of cells with *L. casei* CIRM-BIA 667 (gray bars) at a ROI of 2000:1.

B: *S. aureus* RF122 and NB305 populations in internalization assay supernatant after 2 h of infection at a MOI of 100:1, either alone or in coinfection with *L. casei* CIRM-BIA 667 (gray bars) at a ROI of 2000:1.

Data are presented as mean $\pm$ Standard Deviation. Each experiment was done in triplicate and differences between groups were compared using Student's t test. (NS: not significant).

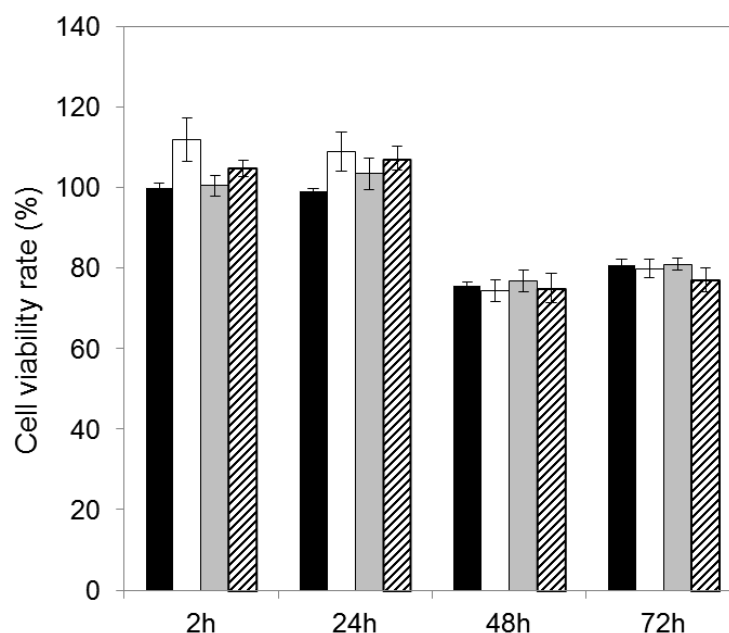


FIG S2 *S. aureus* RF122 and *L. casei* CIRM-BIA667 did not affect bMEC viability.

bMEC viability was determined following 2 h of infection by *S. aureus* RF122 alone (white bars), *L. casei* CIRM-BIA667 alone (gray bars), or coinfection by *S. aureus* and *L. casei* (hatched bars). *S. aureus* RF122 was used at a MOI of 1:100 and *L. casei* at 2000:1 in DMEM. bMEC alone was used as a positive control (black bars, 100 % viability) and cells treated with 0.01 % triton as a negative control (0 % viability at each time point, not shown). Cell viability was assessed at 2 h, 24 h, 48 h and 72 h post-infection by MTT assay. Results are expressed relative to viability of bMEC alone after 2 h of infection

- **Recherche des mécanismes responsables de l'inhibition de l'internalisation de *S. aureus***

L'étude *in vitro* sur modèle cellulaire présentée ci-dessus a permis de révéler un potentiel inhibiteur de *L. casei* vis-à-vis de l'invasion de *S. aureus*. Si l'effet est mitigé concernant l'adhésion, les résultats ont clairement identifié un net potentiel de *L. casei* à inhiber l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales mammaires MAC-T.

Les connaissances du processus infectieux de *S. aureus* ont permis d'identifier les facteurs protéiques impliqués dans l'internalisation du pathogène (Cf Chapitre I-C). L'un des points essentiels à l'entrée de *S. aureus* dans les cellules épithéliales de la glande est la formation d'un « pont » protéique entre la bactérie et la cellule hôte. Ce pont fait intervenir la protéine de liaison à la fibronectine de *S. aureus*, la fibronectine et la l'intégrine cellulaire $\alpha 5 \beta 1$ (Fig 18). De manière intéressante, le génome de *L. casei* renferme un gène codant pour une protéine de liaison à la fibronectine comme celle de *S. aureus*. Ce gène est présent dans plusieurs génomes de cette espèce, et notamment la souche BL23.

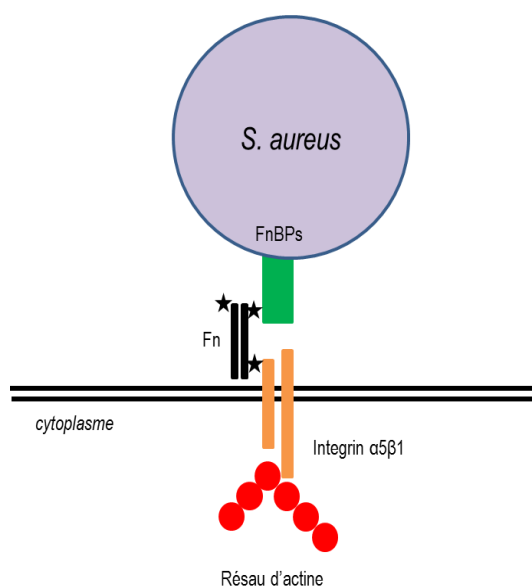


Figure 18 : Représentation schématique de l'interaction initiale requise pour l'internalisation de *S. aureus* (d'après Fraunholz et Sinha, 2012)

Des travaux menés avec la souche *L. casei* BL23 délétée du gène *fbpA* ont montré que ce gène codait effectivement pour une protéine localisée à la surface de la bactérie et impliquée dans l'adhésion à la fibronectine (Munoz-Provencio et al., 2009). Par contre, l'adhésion à des cellules intestinales de type Caco-2 ou HT29 de la souche BL23 Δ *fbpA* n'est que faiblement modifiée suggérant que le rôle de cette protéine dans l'adhésion aux cellules n'est pas majeur ou qu'il existe une certaine redondance, ainsi que semblent le confirmer des travaux menés récemment dans cette même équipe (Munoz-Provencio et al., 2011). L'impact de FbpA sur l'internalisation de *L. casei* n'est, par contre, pas documenté. Notre hypothèse de travail a donc été que l'inhibition de l'internalisation exercée par *L. casei* pouvait reposer sur

une compétition pour la liaison à la fibronectine impliquant la Fibronectine binding protein (FbpA) de *L. casei*.

Lors des expériences d'interaction, nous avons observé que la souche de *L. casei* BL23 possède aussi une capacité d'inhibition vis-à-vis de l'internalisation de *S. aureus*. Nous avons comparé les capacités d'inhibition de cette souche avec son mutant BL23 Δ *fbpA*, fournie par l'équipe de V. Monedero (Munoz-Provencio et al., 2009).

La souche de *L. casei* BL23 Δ FnbA conserve un fort potentiel d'inhibition de l'internalisation des cellules épithéliales mammaires MAC-T par *S. aureus*, équivalent à celui de la souche sauvage (figure 19), écartant ainsi l'hypothèse de départ. La Fibronectine binding protein A (FnbA) de *L. casei* n'est pas impliquée dans l'inhibition de l'internalisation de *S. aureus*. L'hypothèse d'une compétition pour la fixation à la fibronectine ne peut cependant pas être totalement exclue puisqu'il semble exister plusieurs protéines de surface capables de se lier à la fibronectine chez *L. casei* (Munoz-Provencio et al., 2011).

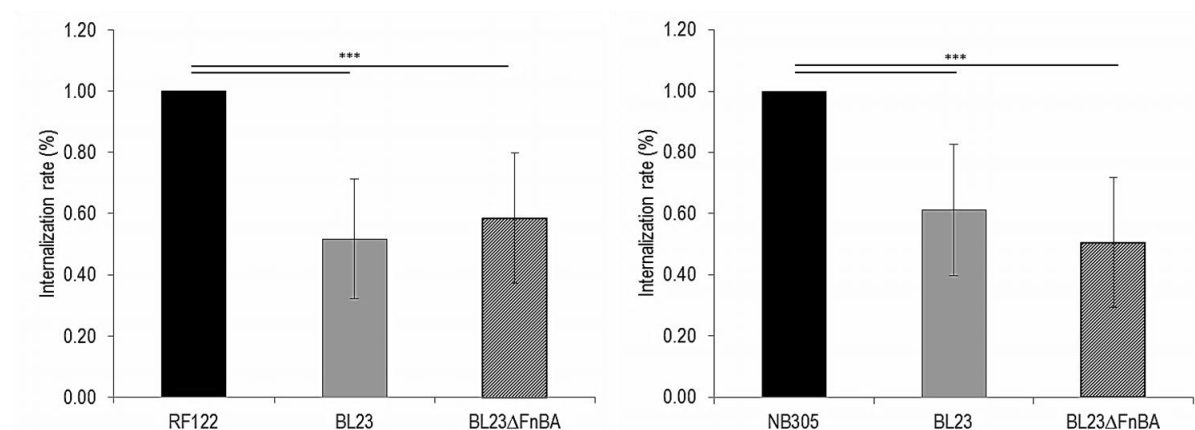


Figure 19 : Inhibition de l'internalisation de *S. aureus* RF122 et NB305 par *L. casei* BL23 ou son mutant BL23 Δ FnbA aux cellules MAC-T.

Les résultats obtenus nous permettent de savoir que l'inhibition de l'adhésion requiert un contact direct de *L. casei* viable ou non, alors que l'inhibition de l'internalisation requiert un contact direct avec des *L. casei* viables.

Ces résultats permettent d'éliminer le rôle de la fibronectine-binding protein de *L. casei* dans son potentiel à inhiber l'internalisation de *S. aureus*. Cependant, l'analyse des génomes, notamment des *L. casei* à révéler la présence de nombreuses protéines ayant elles aussi de fortes affinités pour certaines protéines de la matrices cellulaires comme le collagène

ou encore la fibronectine. Les connaissances sur ces protéines identifiées comme sortases, malgré un rôle important dans le dialogue avec l'Hôte, restent limitées (Munoz-Provencio et al., 2012). Ces nouvelles protéines membranaires de *L. casei* ne permettent donc pas d'éliminer l'hypothèse d'une compétition pour un site d'attachement comme les intégrines $\alpha 5 \beta 1$.

CHAPITRE V

Conclusions et perspectives

*« Quelques données complémentaires
et mise en perspective des résultats obtenus »*

Les mammites représentent l'une des principales pertes économiques dans les élevages laitiers (Oviedo-boyso et al., 2007). *S. aureus* est l'un des pathogènes majeurs associés aux mammites chez les ruminants. Cependant, malgré les problèmes importants qu'il entraîne en santé animale, peu de données sont disponibles concernant son cycle infectieux, les mécanismes mis en jeu dans les interactions avec son hôte (tissus épithéliaux et microbiote). Depuis quelques années, les outils de génomique et les modèles cellulaires (*in vitro*) permettent une analyse fine de l'ensemble des mécanismes impliqués dans le processus infectieux de *S. aureus* dans la glande mammaire et ce dernier est de mieux en mieux compris. Toutefois, faute de validation sur modèle bovin, les résultats sont difficilement extrapolables au contexte *in vivo*, car l'environnement conditionne inévitablement le devenir de ces interactions. Pour l'heure, aucune solution efficace ne permet de faire face à cette pathologie tant en préventif qu'en curatif.

La diversité des tableaux cliniques engendrés lors de mammites à *S. aureus* est un élément clé lié à ce pathogène et qui peut en partie expliquer l'échec des nombreuses approches testées. Ce pathogène peut induire des infections intramammaires allant de la mammite subclinique-chronique à la mammite gangréneuse (Le Loir et Gautier, 2010). Bien sûr, les facteurs de l'hôte interviennent dans l'issue de l'infection (fond génétique, état sanitaire général, âge de l'animal, nombre de lactations...) (Rupp et Boichard, 1999 ; 2003). Pour notre part, nous nous sommes intéressés aux facteurs bactériens de notre pathogène modèle, *S. aureus* ainsi qu'à l'écosystème microbien de la glande mammaire, en vue d'améliorer nos connaissances sur ces deux acteurs du pathosystème (hôte/pathogène/ecosystème) et d'orienter notre recherche vers le développement de solutions alternatives.

L'utilisation d'antibiotique étant limitée dans l'ensemble des systèmes d'élevage en raison des risques d'émergence et de propagation de souches résistantes et des conséquences directes en santé publique, il y a un réel besoin de moyens de lutte alternatifs et non-antibiotiques dans le cadre d'une agriculture durable, respectueuses du bien-être animal et de l'environnement (plan d'action Ecoantibio 2012-2017). Le concept de probiotique, bien établi chez l'Homme au niveau des écosystèmes intestinal et vaginal, constitue une voie à explorer dans un contexte mammaire (Nader-Macias et al., 2008, Ouwehand et al., 2002 ; Reid G., 2002). Un déséquilibre de la composition ou de l'abondance du microbiote (dysbiose) entre espèces commensales et pathogènes opportunistes entraîne une perte de l'homéostasie

(Ouwehand et al., 2002). L'introduction dans ces écosystèmes en dysbiose de flores probiotiques permet de restaurer cet équilibre. Cet effet bénéfique repose sur un effet antagoniste direct ou indirect sur les flores délétères (Reid et al., 2006). Le développement de probiotiques repose généralement sur un isolement de bactéries candidates de l'écosystème ciblé puis sur la caractérisation de leur potentiel probiotique. Pour l'heure, l'écosystème microbien de la mamelle de vache n'a été que peu étudié. La littérature fait état de quelques études décrivant la diversité soit par approche culturale (Woodward et al., 1987 ; Gill et al., 2006 ; Espeche et al., 2009) soit par des approches métagénomiques (Oikonomou et al., 2012). Cette dernière étude souligne une variation de la composition de l'écosystème mammaire bovin en fonction de l'état sanitaire suggérant que la notion de dysbiose s'applique au contexte de la glande mammaire bovine. Grâce à leur statut d'innocuité, les bactéries lactiques représentent des candidats pertinents pour le développement de probiotiques mammaires.

L'objectif de cette thèse était multiple. Il concernait les trois acteurs du pathosystème. Il s'agissait d'abord d'identifier les facteurs staphylococciques impliqués dans la chronicité des mammites, ces facteurs constituant des cibles privilégiées pour un développement thérapeutique. Nous nous sommes ensuite intéressés à la composante « microbiote » du système, en isolant des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin et en caractérisant leur potentiel probiotique. Enfin, nous avons réuni les 3 acteurs pour évaluer la capacité de certaines bactéries lactiques à inhiber des étapes clé de l'infection, l'adhésion et l'internalisation, ces étapes étant souvent avancées pour expliquer la chronicité.

Quels sont les facteurs staphylococciques impliqués dans la chronicité de l'infection ? La composition en bactéries lactiques est-elle modifiée selon le statut sanitaire de l'animal ? Existe-t-il des espèces marqueurs d'un statut sanitaire ? Les bactéries lactiques de l'écosystème mammaire possèdent-elles des propriétés probiotiques d'intérêts ? Les bactéries lactiques ont-elles la capacité de réduire l'invasion de *S. aureus* et si oui, quels sont les mécanismes mis en jeu ? Dans ces dernières pages du manuscrit, nous discuterons les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, nous en présenterons aussi les limites. Enfin, nous aborderons les perspectives de ce projet.

- **Différences de sévérité dans les mammites induites par *S. aureus*.**

L'objectif est mieux comprendre les mécanismes mis en jeu par *S. aureus* impliqués dans la chronicité de ses infections. Pour cela, une comparaison génomique, protéomique et phénotypique de deux souches de *S. aureus* induisant des tableaux cliniques différents a été réalisée. La souche de *S. aureus* RF122 isolée d'un cas de mammite clinique et connue comme étant fortement virulente (Herron-Olson et al., 2007) et la souche de *S. aureus* Newbould 305 connue pour induire des mammites moins sévères avec une tendance à la chronicité (Prasad et Newbould, 1968).

➤ *Comparaison entre S. aureus RF122 et NB305.*

D'après la littérature scientifique, trois critères majoritaires semblent être impliqués dans le degré de sévérité des souches de *S. aureus* et pourrait expliquer le caractère chronique de certaines souches comme la Newbould 305. En effet, les capacités de cytotoxicité, de formation de biofilms et d'invasion cellulaire peuvent varier en fonction des souches, et conduire ainsi à des mammites plus ou moins sévères. Nos diverses approches ont permis de dégager des hypothèses concernant l'implication de certains facteurs staphylococciques dans la chronicité des mammites.

Au niveau génomique, nous avons réalisé une comparaison non exhaustive du génome de RF122 avec celui récemment obtenu de la Newbould 305 en ciblant les gènes de virulence (*sea*, *hla*, *hlg*, *luk*...), les gènes de formation de biofilm (*ica* et *bap*) ainsi que les gènes impliqués dans l'invasion cellulaire (*fnb*, *clf*, *eap*...). Cette analyse comparative a permis d'identifier des différences pour les gènes de virulence notamment ceux codant pour des toxines staphylococciques. Cette différence de composition génique est à corrélérer avec la différence de composition en éléments génétiques mobiles entre les deux souches. Concernant l'équipement génétique, la souche *S. aureus* RF122 possède beaucoup de gènes codant pour des entérotoxines. Ces entérotoxines possèdent une activité super-antigénique impliquée dans la perturbation de la réponse immunitaire (Ebling et al., 2001 ; Haenni et al., 2010 ; Mullarky et al., 2001). De plus, seule la RF122 possède les gènes codant pour la leucotoxine *lukM/F'*. Cette leucotoxine est cytotoxique pour les polynucléaires et les monocytes et souvent décrite comme entraînant une forte réaction inflammatoire dans la glande mammaire pouvant aller

jusqu'à la mammite gangréneuse (Rainard, 2007 ; Fromageau et al., 2010 ; 2011). A l'inverse, *S. aureus* Newbould 305 ne possède que peu de gènes d'entérotoxines. De plus, NB305 ne possède pas le gène *lukM*, nécessaire à la formation de la toxine active LukM/F'. Tout comme la souche RF122, la souche Newbould 305 possède de nombreux gènes d'hémolysines (*hla*, *hly*, *hld*, *hlg* avec un effet cytotoxique pour les cellules épithéliales mammaires et les polynucléaires). Ces observations au niveau génomique ont été pour certaines confirmées par l'analyse protéomique des souches et semblent déjà souligner des différences entre ces deux souches qui induisent des tableaux cliniques différents.

Concernant la capacité à former des biofilms, l'analyse génomique nous a révélé que la souche chronique Newbould 305 présente de nombreux gènes impliqués dans la formation de biofilm dont le gène *bap* (biofilm associated protein) qui est absent de la souche RF122. Or la littérature cite l'implication de ce gène dans l'orientation de l'infection vers un phénotype persistant correspondant bien à celui de la souche Newbould 305 (Cucarella et al., 2002 ; 2004). Cependant l'analyse de la capacité des deux souches à former des biofilms, sur des surfaces abiotiques, n'a révélé aucune différence significative dans les conditions testées.

Outre ces différences liées à la cytotoxicité et la formation de biofilms, de nombreuses différences ont été notées sur leur contenu en gènes codant pour des MSCRAMMs. De nombreuses études ont montré l'importance de ces protéines dans la colonisation, l'invasion et la persistance de *S. aureus* dans les tissus de l'hôte (Heilmann C., 2011). De même, notre étude révèle que la souche Newbould 305, qui engendre des mammites subcliniques et chroniques, présente un équipement génétique en MSCRAMMs plus important que la souche RF122. Newbould 305 produit notamment les protéines FnbA, FnbB, SasG, et Pls qui participent grandement à l'adhésion et l'internalisation aux cellules épithéliales (Sinha et al., 2010 ; Fraunholz et Sinha, 2012 ; Geoghegan et al., 2010). De plus, l'analyse de la séquence de *fnbA* a montré que la copie de Newbould 305 possède deux domaines de liaison à la fibronectine de plus que celle de RF122, pouvant lui attribuer une affinité supérieure à la fibronectine. Cette capacité d'invasion accrue de la souche chronique NB305 a été confirmée sur modèle cellulaire : ses taux d'adhésion et d'internalisation sont significativement supérieurs à ceux de la souche RF122.

L'ensemble de ces résultats préliminaires, basés sur des comparaisons *in silico* et *in vitro*, permettent de souligner l'importance de certains facteurs staphylococciques dans le

degré de sévérité des mammites. Concernant les critères de la chronicité, l'étude sur notre modèle cellulaire MAC-T a permis d'identifier que la principale différence entre ces souches au niveau phénotypique repose sur leur capacité respective à envahir les cellules. Ce résultat semble révéler qu'une souche avec un fort potentiel d'adhésion et d'internalisation au tissu (et possédant les gènes associés) sera plus apte à induire des mammites chroniques. Cependant, ces conclusions tirées uniquement de données bibliographiques et d'expériences *in vitro* ne peuvent être extrapolées aux phénomènes *in vivo*. Malgré tout, ces observations nous permettent d'identifier les étapes du cycle infectieux à cibler pour le développement d'une approche alternative. Les étapes d'adhésion et d'internalisation de *S. aureus* semblent majeures dans le processus infectieux et caractérisent la souche chronique Newbould 305.

➤ *Localisation intracellulaire de S. aureus*

Durant l'étude de l'internalisation de *S. aureus* aux cellules épithéliales mammaires, de nombreuses observations ont été réalisées au sein du groupe concernant le devenir des *S. aureus* internalisés. Pour cela, plusieurs expériences préliminaires ont été réalisées par des approches de microscopie afin d'explorer l'impact de l'internalisation de *S. aureus* sur les cellules infectées. Outre l'effet cytopathique identifié par les travaux de N. Berkova (Alekseeva et al., 2013), ces travaux qui intéressent l'équipe de recherche ont permis de montrer, la localisation périnucléaire des *S. aureus* internalisés (figure 20). La compréhension du devenir de *S. aureus* une fois internalisé dans la cellule sera donc à préciser car cette capacité de survie dans les cellules de l'hôte semble majoritairement impliquée dans le caractère chronique des infections liées à *S. aureus*.

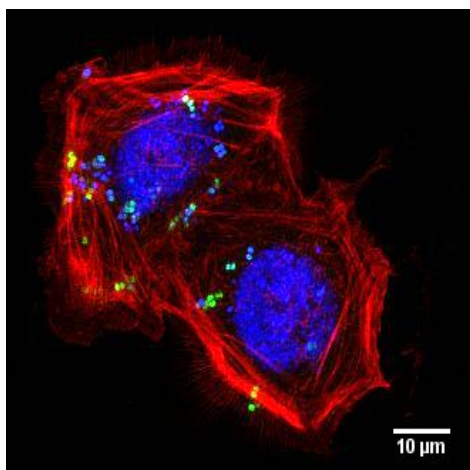


Figure 20: Observation en microscopie confocale de l'internalisation de *S. aureus* au sein de cellules MAC-T. En rouge, réseau d'actine cellulaire marqué à la phalloïdine-TRITC, en bleu, marquage des acides nucléiques au DAPI et en vert observations des *S. aureus* internalisés exprimant la GFP.

- **Composition de la flore lactique de l'écosystème mammaire et potentiel probiotique.**

L'objectif est ici d'améliorer les connaissances sur la composition de l'écosystème mammaire et plus spécifiquement, d'isoler et d'identifier les BL de cet écosystème et de les caractériser sur la base de leurs propriétés probiotiques.

➤ *Composition de la flore lactique de l'écosystème mammaire bovin.*

La campagne de prélèvement nous a permis de collecter 165 isolats dont 139 ont été identifiés au niveau de l'espèce et 26 au niveau du genre seulement. Ces isolats, obtenus par enrichissement et isolement sur milieux sélectifs correspondaient essentiellement à des flores lactiques (lactocoques, lactobacilles, entérocoques et streptocoques). Une première analyse des espèces identifiées dans les échantillons correspondant à des trayons sains versus des trayons infectés n'a pas permis de révéler de différences entre ces deux types d'échantillons puisqu'on retrouve globalement les mêmes espèces quel que soit l'état sanitaire. En particulier des lactobacilles, connus pour exercer un rôle probiotique dans d'autres écosystèmes, ont été isolés dans les deux écosystèmes. Toutefois cette étude préliminaire, faite sur un faible nombre d'individus, ne révèle qu'un aspect qualitatif et non quantitatif des populations présentes en fonction du statut sanitaire du trayon. Or il est bien établi que lors d'une infection, les populations bactériennes sont modifiées parfois par acquisition/perte mais dans la majorité des cas par une perte de l'abondance des populations à effet protecteur. La quantification exacte de chacune des espèces dans un écosystème sain par rapport à un écosystème en dysbiose devra impérativement être réalisée pour identifier des espèces marqueurs d'un statut sanitaire.

L'écosystème mammaire doit encore être investigué pour mieux cerner sa composition, son potentiel barrière vis-à-vis des infections, ou encore son rôle dans l'homéostasie du tissu, tant au niveau immunitaire que fonctionnel. Les études disponibles pour l'heure sont encore rares et donnent de cet écosystème une image qui contraste quelque peu avec celle des écosystèmes intestinal et vaginal qui, par comparaison, semblent avoir une abondance et une diversité plus élevées. Par ailleurs, les bactéries lactiques ne sont pas dominantes dans cet écosystème (contrairement à l'écosystème vaginal). Se pose alors la question de leur capacité à influencer sur l'équilibre du microbiote endogène dominé par d'autres espèces et sur le statut sanitaire de l'organe (par ex. immuno-modulation). On peut opposer à

cette crainte les effets positifs démontrés de *Faecalibacterium prausnitzii* qui possèdent un fort potentiel anti-inflammatoire tout en étant peu abondante au sein du microbiote intestinal (Sokol et al., 2008).

La caractérisation de l'écosystème mammaire bovin se poursuit au sein du laboratoire notamment grâce à l'obtention d'un projet du métaprogramme INRA MEM (Métagénomique et Ecosystème Microbien) intitulé « Milk Ecosystem and Udder Health ». Ce projet vise à explorer la composition de l'écosystème mammaire bovin par une approche métagénomique. Cette approche devrait nous apporter des éléments de réponses sur la composition qualitative et quantitative de l'écosystème en lien avec la susceptibilité aux infections mammaires.

➤ *Caractérisation du potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire.*

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé le potentiel probiotique de souches de bactéries lactiques isolées de l'écosystème mammaire. Nous avons retenu 22 souches correspondant à des espèces non impliquées dans des mammites.

Les critères pour l'identification du potentiel probiotique des souches ont été sélectionnés après analyse de la littérature. Outre ces critères, nous nous sommes intéressés à une caractéristique peu ou pas discutée dans la littérature mais qui nous semblait pertinente : l'internalisation des bactéries lactiques dans les cellules épithéliales mammaires. En effet, la littérature scientifique souligne l'importance de la colonisation du tissu par les bactéries lactiques mais ne révèle pas de capacité d'internalisation de leur probiotique. Certaines études utilisent les bactéries lactiques comme vecteurs pour internaliser des molécules ou de l'ADN, attestant de cette capacité à entrer dans les tissus (Innocentin et al., 2009). De plus, la sélection de souches lactiques à fort taux d'adhésion et d'internalisation pourrait leur conférer un fort potentiel à entrer en compétition avec les pathogènes pour lesquels ces deux étapes constituent des étapes clés du processus infectieux (par exemple, *S. aureus* dans le cadre de mammites chroniques (Fraunholz et Sinha, 2012)). Les critères de sélection *in vitro* de souches probiotiques retenus sont : l'hydrophobicité et l'autoaggrégation (favorisant les interactions directes bactéries lactiques/ pathogène et bactéries lactiques/ cellules épithéliales mammaires) (Campana et al., 2012 ; Kmet et Lucchini, 1997), l'adhésion et l'internalisation (compétition ou inhibition de l'invasion cellulaire par le pathogène) (Chan et al., 1985 ; La Ragione et al.,

2004 ; Callaway et al., 2008) et l'immunomodulation (potentiel des bactéries lactiques à stimuler le système immunitaire) (Amdekar et al., 2011 ; Lebeer et al., 2012 ; Tsai et al., 2012). L'ensemble de ces critères, évalués *in vitro*, ne représente bien sûr pas leur comportement *in vivo* mais constitue un bon moyen de criblage permettant d'identifier les meilleures souches candidates pour un probiotique mammaire. Les données obtenues lors des tests d'hydrophobicité, d'autoaggrégation, d'adhésion et d'internalisation nous ont révélé une forte diversité inter-souches. Sur la base de ces différents critères, quatre souches (2 *L. brevis* et 2 *L. plantarum*) présentent des capacités intéressantes d'adhésion et d'internalisation, à mettre en corrélation, dans la plupart des cas, avec une hydrophobicité et/ou une capacité d'autoaggrégation plus élevées.

x Parmi les critères retenus dans le potentiel probiotique des souches de bactéries lactiques, le potentiel immunomodulateur des bactéries a été testé *in vitro* sur modèle cellulaire. Ce test a été réalisé sur modèle HT-29 et PBMC et permet de hiérarchiser les souches en fonction de leur potentiel pro- ou anti-inflammatoire. Les résultats obtenus en collaboration avec le laboratoire de Philippe Langella (MICALIS) sont actuellement en cours de traitement et viendront bientôt compléter ce travail. Pour l'heure, il est difficile d'émettre des conclusions sur le potentiel immunomodulateur des différentes souches (figure 21). L'intégration des données d'immunomodulation et de la capacité à occuper la niche (adhésion/internalisation) nous permettra de sélectionner des souches candidates pour des études plus approfondies.

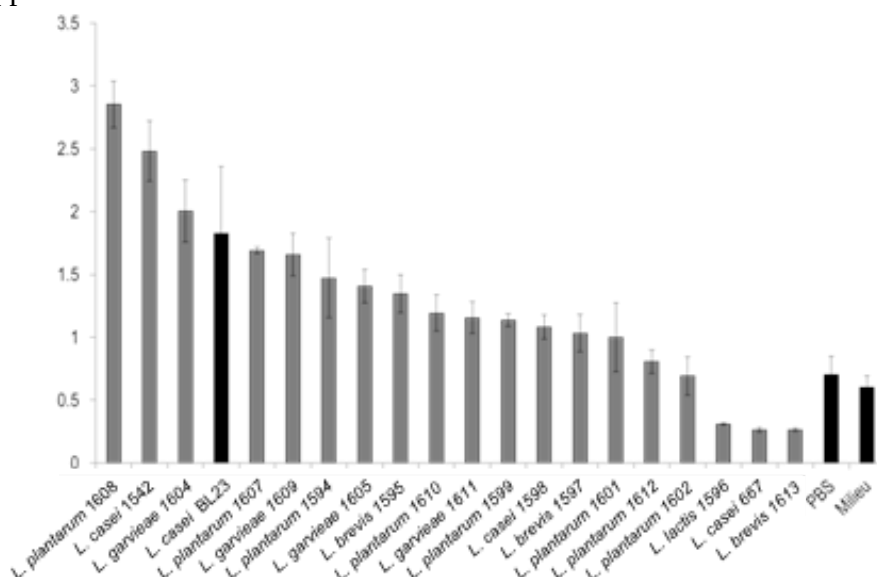


Figure 21 : Résultats préliminaires des dosages en test ELISA de la production d'IL-10 par les PBMCs en interaction avec les différentes souches de bactéries lactiques sélectionnées (résultats préliminaires).

L'aptitude des souches à inhiber l'adhésion et l'internalisation dans le tissu mammaire sera évaluée *in vitro* dans notre modèle d'interaction tripartite. Pour cela, les mêmes souches de *S. aureus* seront utilisées mais d'autres pathogènes pourront être intégrés à l'étude comme *E. coli* et *S. uberis*. Cet aspect permettra la sélection de souches candidates inhibant les étapes majeures du processus infectieux. En collaboration avec le CERELA (Tucuman, Argentine), laboratoire de référence sur les bactéries lactiques, où une partie des résultats de cette thèse a été obtenue, nous espérons pouvoir tester l'innocuité des meilleures souches candidates sur modèle bovin en injection intramammaire.

Cette étape est indispensable dans l'objectif d'un probiotique mammaire et nous permettra de mieux comprendre l'impact *in vivo* de nos souches sur les profils cytokinique et histologique de la glande mammaire suite à l'injection, la première qualité de ce type d'approche étant, *a minima*, de ne pas nuire à l'animal sur le principe du « *primum non nocere, deinde curare* » (d'abord ne pas nuire, ensuite soigner).

- **Inhibition de l'invasion de *S. aureus* par *L. casei*.**

L'une des hypothèses avancées dans la littérature pour expliquer la persistance des infections à *S. aureus* dans la glande mammaire implique l'adhésion et l'internalisation de la bactérie dans les cellules hôtes (Sinha et al., 2010 ; Fraunholz et Sinha, 2012). Suite à l'internalisation, *S. aureus* possède la capacité de survivre dans les cellules. L'analyse des facteurs de virulence impliqués dans la chronicité de la souche NB305 semble confirmer que la capacité d'internalisation est une caractéristique bactérienne déterminante dans la chronicité des infections intramammaires liées à *S. aureus*. Nous avons donc choisi de tester la capacité de bactéries lactiques à inhiber ces deux étapes clé du cycle infectieux de *S. aureus* que sont l'adhésion et l'internalisation dans un modèle cellulaire.

Nous avons mis au point les conditions d'interaction tripartites dans notre modèle cellulaire permettant d'observer une inhibition significative de l'adhésion et de l'internalisation de *S. aureus* dans des cellules MAC-T. Dans ce modèle, nous avons choisi d'utiliser des souches de *L. casei*. Cette espèce de bactéries lactiques est déjà documentée par ailleurs pour ses propriétés probiotiques et des souches bien caractérisées (séquences génomiques et mutants disponibles) peuvent servir de référence. De plus, des études antérieures réalisées par l'équipe dans le cadre du projet ANR NABAB ont révélé la capacité

de souches de *L. casei* à moduler la formation de biofilm par *S. aureus* (rédaction en cours). Nos résultats ont ainsi révélé que *L. casei* inhibe l'internalisation de *S. aureus* de près de 80 % dans les CEM. Ces résultats ont été obtenus notamment avec la souche *L. casei* 1542 isolée du microbiote mammaire bovin. Cette souche semble plus efficace que les souches de référence (CIRM667 ou BL23) puisqu'une moindre concentration en bactéries lactiques confère le même taux d'inhibition de l'internalisation de *S. aureus*. Ce résultat majeur révèle que les bactéries lactiques de l'environnement mammaire peuvent protéger de l'invasion par *S. aureus*.

- **Identification des mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de l'internalisation de *S. aureus* par *L. casei***

Concernant l'inhibition de l'internalisation, nous avons identifié que celle-ci requérait un contact direct entre la bactérie lactique vivante et *S. aureus* et/ou les cellules épithéliales mammaires. Les lactobacilles présentent des protéines de liaison à la fibronectine (Fnbp) similaires à celles de *S. aureus*. L'utilisation d'une souche *L. casei* BL23 délétée de son gène majeur de Fnbp n'a cependant pas permis de lever cette inhibition. Soit d'autres Fnbp interviennent dans ce phénomène, soit des composantes autres que les Fnbp sont à l'oeuvre. Nous ne disposons malheureusement pas de mutants pour d'autres Fnbp chez *L. casei*. Ceux-ci sont à construire. Il serait par ailleurs intéressant de tester l'impact que peut avoir *L. casei* sur le profil d'expression de certains gènes de virulence de *S. aureus* (toxines, MSCRAMMs, SERAMs) et de certains facteurs cellulaires au cours de la coincubation (cytokines, récepteurs membranaires...). La modulation de l'expression de facteurs de virulence chez *S. aureus* par des bactéries lactiques (en l'occurrence *L. lactis*) a d'ailleurs déjà été mise en évidence par l'équipe dans d'autres contextes (Even et al., 2009, Cretenet et al., 2011). En ce qui concerne l'effet de *L. casei* sur l'expression de la virulence chez *S. aureus*, les gènes impliqués dans la régulation de la virulence, l'adhésion et l'internalisation (par ex. : *fnb*, *clf*, *atl*, *hla*, *hly*, *agr*) seront ciblés (tableau 11). Ces expérimentations seront menées dans les mois à venir. Des changements d'expression génique induits par les bactéries lactiques sur les cellules épithéliales mammaires sont également envisageables. Ils peuvent, par exemple, conduire à une modification des récepteurs membranaires impliqués dans l'interaction avec le pathogène. Ces hypothèses n'ont pu être entièrement testées au cours de ma thèse. J'ai cependant initié une étude préliminaire sur la réponse cellulaire mise en place dans notre modèle d'interaction, par RT-PCR quantitative. La sélection des gènes s'est orientée sur les récepteurs

membranaires impliqués dans les mécanismes de défense et dans le mécanisme d'internalisation du pathogène (tableau 11).

Ainsi, l'expression des gènes spécifiant les TLR 1, 2, 4, les récepteurs NOD 1 et 2 et les intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ a été suivie. Afin de normaliser l'ensemble des résultats, trois gènes normalisateurs ont été sélectionnés, ACTB, GAPDH et PPIA. Les résultats obtenus sont très préliminaires et suggèrent surtout une faible expression de ces différents gènes dans nos conditions d'interaction (après 2 h de co-incubation) (figure 22). Des essais avec une interaction plus longue entre bactéries lactiques et cellules ont été réalisés et ont révélés une surexpression des gènes codant pour les récepteurs membranaires (TLR) et un gène codant pour une cytokine proinflammatoire (TNF- α). En outre, il semble opportun de tester d'autres lignées de CEM. La lignée MACT-T utilisée dans ce travail présente d'indéniables avantages de praticité mais est peu sensible aux stimuli (en termes d'immunité innée, d'expression de cytokines...). Des expérimentations sur une lignée plus sensible, telle la lignée BME-UV, ou encore sur des cellules en culture primaire devraient donner des résultats plus tranchés ou du moins plus proches de la réalité (réponse des cellules *in vivo*) (Fitzgerald et al., 2007 ; Sorg et al., 2013 ; Liu et al., 2011).

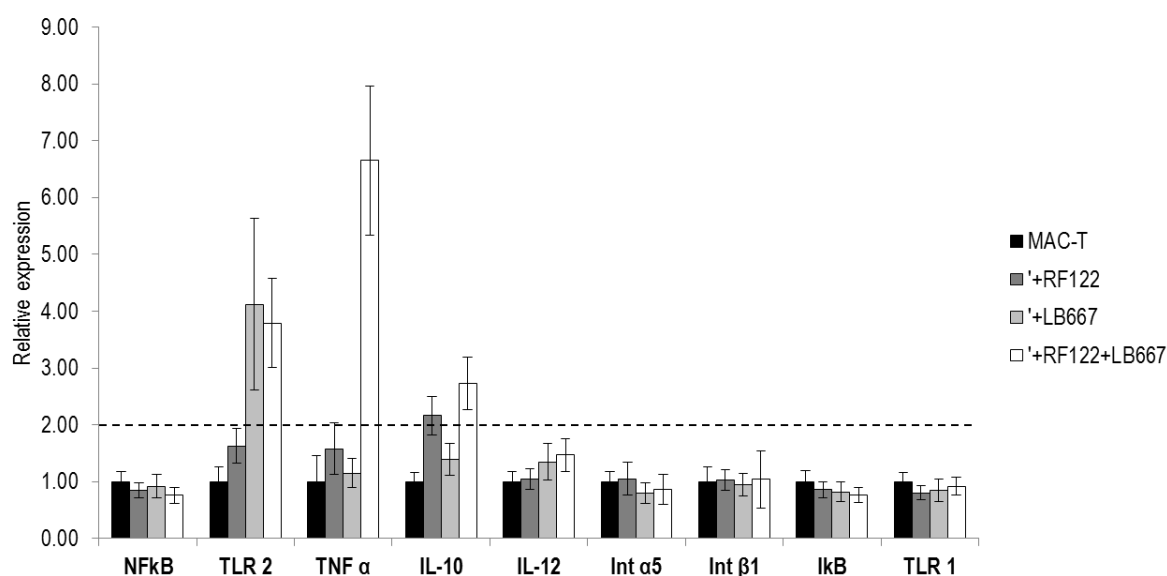


Figure 22 : Résultats préliminaires de l'expression des gènes cellulaires par qRT-PCR au cours d'une interaction bi ou tripartite. Lignée de CEM MAC-T, RF122, souche *S. aureus* RF122, LB667, souche *L. casei* CIRM667.

Enfin, l'effet barrière des bactéries lactiques vis-à-vis de *S. aureus* pourrait être plus large que la seule inhibition de la colonisation des tissus et reposer sur une stimulation du système immunitaire. Cette stimulation de la réponse immunitaire a d'ailleurs été mise en évidence lors d'un essai *in vivo*, visant à comparer l'effet d'une injection intramammaire d'un lactocoque avec un traitement antibiotique pour le traitement de mammites (Klostermann et al., 2008 ; Crispie et al., 2008). En outre, nous avons montré une capacité immunomodulatrice de nos souches de BL isolées de l'écosystème mammaire sur un modèle PBMC (Cf Chapitre III). Il semble pertinent de poursuivre cette caractérisation des BL à moduler la réponse immunitaire innée (interleukines, défensines...) des cellules épithéliales mammaires bovines, voire des cellules immunitaires professionnelles faisant partie des cellules somatiques. Nous avons d'ores et déjà sélectionné plusieurs gènes comme ceux codant pour les cytokines IL-1, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, le facteur TNF- α , majoritairement impliqués dans la réponse immunitaire de la glande mammaire lors de mammites staphylococciques. La défense de la glande mammaire passe également par l'expression de certains peptides antimicrobiens notamment LAP, TAP et les β -défensines 1 et 5 ou encore la protéine S100.

Malgré le peu de connaissances sur les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de l'internalisation de *S. aureus* par *L. casei*, nos résultats révèlent principalement que l'utilisation de souches bactéries lactiques et notamment de *L. casei* permet de réduire considérablement la quantité de pathogène internalisé et ce, sans avoir d'effets délétères sur la morphologie et la viabilité des cellules en culture (*primum non nocere*). L'ensemble de ces observations devra bien sûr être validé *in vivo* (modèle bovin ou petits ruminants).

- **La stratégie de traitement : vers une meilleure connaissance du microbiote mammaire**

Au cours de ces dernières années, le développement des approches de biologie moléculaire et de métagénomique a permis une meilleure caractérisation du microbiote mammaire bovin. L'analogie avec d'autres écosystèmes, mieux caractérisés, permet d'émettre l'hypothèse de l'existence d'une flore endogène protectrice (majoritairement la composante lactique pour l'écosystème vaginal) assurant le maintien de l'homéostasie de l'écosystème mammaire. Au cours de cette étude, nous avons donc isolé des bactéries lactiques et caractérisé leur potentiel probiotique. De plus, l'étude de la souche *S. aureus* Newbould 305 nous a permis d'identifier que l'adhésion et l'internalisation semblent être des étapes majeures

impliquées dans la chronicité des infections. Nous avons par la suite identifié des souches de *L. casei* capables d'inhiber ces deux étapes du cycle infectieux de *S. aureus*.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse constituent une première étape dans la compréhension des mécanismes de la chronicité de *S. aureus* et dans la possibilité de développer un traitement alternatif aux antibiotiques, utilisant le potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire. L'attestation de l'innocuité sur modèle bovin de nos souches de bactéries lactique et des tests *in vivo* de traitements d'infections expérimentales seront bien sûr nécessaires pour valider et consolider ces résultats. Plusieurs pistes peuvent être explorées concernant notamment le mode d'administration : pour la prévention, solution de trempage (teat dip) entre deux traites, bouchon mammaire (teat seal) posé au tarissement ; pour un traitement, solution pour injection intramammaire... De même, une étude de terrain auprès des éleveurs (agricultures biologique et conventionnelle) et des prescripteurs (centres techniques, groupements vétérinaires) devra être menée pour évaluer l'acceptabilité de ce type de traitement.

Tableau 11: Liste des gènes de *S. aureus* et des cellules eucaryotes bovines identifiés pour l'analyse de l'expression génétique par qRT-PCR (d'après Bougarn et al., 2011 ; Porcherie et al., 2012 ; Rainard et al., 2006 ; Heilmann et al., 2011)

<i>S. aureus</i>		MAC-T	
References	Ligands et fonctions	References	
<i>hu</i>	DNA-binding protein	ACTB	β -Actin
<i>gyrB</i>	subunit B of DNA gyrase	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Regulators	Ligands et fonctions	PPIA	peptidylprolyl isomerase A
<i>sigB</i>	alternative sigma factor	Host immune response	
<i>sarA</i>	staphylococcal accessory regulator	IL-1 α	secreted by epithelial, activation of inflammatory response
<i>agrA</i>	accessory gene regulator A	IL-1 β	secreted by epithelial, activation of inflammatory response
Surface proteins	Ligands et fonctions	IL-10	anti-inflammatory cytokine
<i>sdrC</i>	Sdr-protein family, epithelial binding	IL-12	pro-inflammatory cytokine
<i>fnbA</i>	fibronectin-binding protein	TNF- α	systemic inflammation and stimulate the acute phase reaction
<i>clfA</i>	clumping factor, fibrinogen-binding protein	TLR 1	Toll-Like Receptor, PAMPs recognition
<i>clfB</i>			
<i>cna</i>	collagen-binding protein	TLR 2	
<i>eap</i>	extracellular adhesive protein	TLR 4	
		Antimicrobial peptides	
<i>ebpS</i>	Elastin-binding protein	LAP	Lingual Antimicrobial Peptide
<i>emp</i>	extracellular matrix protein-binding protein	TAP	Tracheal Antimicrobial Peptide
<i>spa</i>	Protein A, cell aggregation and von Willebrand factor	DEFB1	β - defensin 1
Secreted proteins	Ligands et fonctions	BNBD5	β - defensin 5
<i>atl</i>	Autolysin, attachment to endothelial cells	Host cells integrins	
<i>hla</i>	Hemolysin α and β epithelial cytotoxicity	inta5	subunit $\alpha 5$ of integrin of eucaryotic cells
<i>hly</i>		int β 1	subunit $\beta 1$ of integrin of eucaryotic cells
		Inflammatory regulator	
		NFkB	Immune response transcription factor

ANNEXE 1

Valorisations des Travaux de Thèse

Valorisation des travaux de Thèse : Publications et Communications

- **Articles publiés dans des journaux scientifiques internationaux à comité de lecture**

DS. Bouchard, L. Rault, N. Berkova, Y. Le Loir and S. Even. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. Appl. Env. Microbiol. 79(3) :887-895.

DS. Bouchard, V. Peton, S. Almeida, C. Le Maréchal, A. Miyoshi, V. Azevedo, N. Berkova, L. Rault, P. François, J. Schrenzel, S. Even and Y. Le Loir. 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. J. Bact. 194-22) :6292-6293.

- **Articles en cours de rédaction à soumettre dans des journaux scientifiques internationaux à comité de lecture**

Vincent Peton*, **Damien S Bouchard***, Sintia Almeida, Lucie Rault, Hélène Falentin, Julien Jardin, Vasco Azevedo, Anderson Miyoshi, Nadia Berkova, Sergine Even and Yves Le Loir. *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated to mild and chronic mastitis, is well armed to invade mammary tissue. **En préparation. (Plos ONE)**

Bouchard Damien S*, Seridan Bianca*, Saraoui Taous, Gonzalez Morano Candelaria, Rault Lucie, Chain Florian, Langella Philippe, Otero Claudia, Nader-Macias Fatima ME, Le Loir Yves and Even Sergine. Probiotics properties of Lactic Acid Bacteria isolated from bovine mammary microbiota: Potential allies against bovine mastitis. **En préparation. (Applied and Environmental Microbiology)**

- **Chapitre de livre en cours de rédaction**

Sergine Even, **Damien Bouchard** and Yves Le Loir. Lactic acid bacteria to modulate virulence expression in pathogenic bacteria : an alternative to killing ?. **En préparation. (E. Pessione - “Probiotics and human reciprocal actions”)**

Damien Bouchard, Sergine Even and Yves Le Loir. Lactic Acid Bacteria in Animal Production and health : an alternative to antibiotics use. **En préparation. (F. Mozy - “Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications”-2nd edition-Wiley-Blackwell)**

- **Conférence**

DS. Bouchard, L. Rault, N. Berkova, Y. Le Loir and S. Even. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by *L. casei* CIRM-BIA 667. Club des Bactéries Lactiques, 22 au 24 Mai 2012, Clermont-Ferrand, France.

- **Posters**

- *Présentés lors de congrès nationaux*

DS. Bouchard, L. Rault, N. Berkova, Y. Le Loir and S. Even. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by *L. casei* CIRM-BIA 667. Journées des Microbiologistes de l'INRA, Novembre 2012, L'Isle-sur-la-Sorgue, France.

- *Présentés lors de congrès internationaux*

DS. Bouchard, L. Rault, N. Berkova, Y. Le Loir and S. Even. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by *L. casei* CIRM-BIA 667. International Symposium on Staphilococci and Staphylococcal Infections, Aout 2012, Lyon, France.

DS. Bouchard, L. Rault, N. Berkova, Y. Le Loir and S. Even. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. Cell symposia :Microbiome and Host Health, Mai 2013, Lisbonne, Portugal.

ANNEXE 2

Article de vulgarisation scientifique

« *LUTTE CONTRE LES MAMMITES: LA PISTE DES PROBIOTIQUES* »

Résultats d'expérimentations et de suivis techniques en élevages biologiques en
région Bretagne. Edition 2012 – INTER BIO BRETAGNE

« LUTTE CONTRE LES MAMMITES: LA PISTE DES PROBIOTIQUES »

Maître d'œuvre : UMR 1253 INRA - Agrocampus Ouest STLO Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, Rennes

Partenaires : Inter Bio Bretagne, Réseau GAB/FRAB, Chambres d'Agriculture de Bretagne, Centre International de Ressource Microbienne – Bactéries d'Intérêt Alimentaire. (CIRM-BIA), Structure hébergée au sein du STLO, certifiée ISO9002 ayant pour objectif la conservation et l'étude de la biodiversité des écosystèmes bactériens associés aux denrées alimentaires.

Durée du programme : 2^{ème} année du programme /2 ans

Contexte et enjeux de l'action

Les mammites sont le plus souvent liées à des infections intra-mammaires. Elles représentent un problème sanitaire majeur chez les ruminants et provoquent de lourdes pertes économiques pour la filière laitière. Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est un des principaux pathogènes impliqués dans ces infections dont la prévention (vaccinale) et le traitement (antibiothérapie) se montrent pour l'heure assez inefficaces. De plus, l'usage des antibiotiques est limité en Agriculture Biologique et doit être restreint dans l'ensemble des systèmes d'élevage en raison du risque d'émergence et de propagation de souches résistances et des conséquences directes en santé publique. Il y a donc un réel besoin de moyens alternatifs et non-antibiotiques de lutte contre les mammites dans le cadre d'une agriculture durable, respectueuse des hommes et de l'environnement.

Le concept émergent de lutte biologique et de probiotique mammaire constitue une voie à explorer. Les probiotiques sont utilisés aujourd'hui dans certains écosystèmes naturels, tels que les écosystèmes intestinal et vaginal. Ce sont des écosystèmes riches qui doivent rester équilibrés pour exercer leur rôle positif et notamment leur rôle barrière vis-à-vis des pathogènes. Un déséquilibre de la composition et ou de l'abondance de l'écosystème (dysbiose) est susceptible d'augmenter la fréquence d'infections par des espèces pathogènes. L'introduction de flores probiotiques favorise généralement un retour à l'équilibre de l'écosystème et la restauration de son rôle barrière. L'effet bénéfique des probiotiques peut reposer sur un effet antagoniste direct sur les flores d'altération ou les pathogènes (inhibition

de leur croissance ou de leur virulence), ou indirect (compétition pour les nutriments ou la colonisation du site, stimulation du système immunitaire).

Le développement de probiotiques repose généralement sur l'isolement de bactéries candidates de l'écosystème ciblé, dans la mesure où ces isolats sont, à priori, adaptés à cet environnement. Pour l'heure, l'écosystème microbien de la mamelle de vache n'a été que très peu étudié. La littérature scientifique fait état de quelques études décrivant la diversité microbienne au niveau du canal du trayon chez la vache (Espeche et al. 2009). Une étude récente reposant sur des approches métagénomiques (identification de la flore présente par séquençage global de l'ADN extrait, sans séparation préalable des composantes bactériennes de l'écosystème) a caractérisé l'écosystème mammaire de vaches laitières avec ou sans mammite (Oikonomou et al. 2012). Cette étude souligne une variation de la composition de l'écosystème mammaire bovin en fonction de l'état sanitaire de l'animal et du pathogène responsable de la mammite, suggérant que la notion d'écosystèmes équilibré ou en dysbiose s'applique au contexte de la glande mammaire bovine.

Les bactéries lactiques ont un statut d'innocuité (statut QPS : "Qualified Presumption of Safety"). Elles sont utilisées depuis des milliers d'années pour leurs propriétés technologiques et sont également mises en avant aujourd'hui pour leurs propriétés probiotiques pour l'homme ou l'animal. Les bactéries lactiques constituent de ce fait des candidats pertinents pour le développement de probiotiques mammaires. Elles méritent plus d'attention, d'autant que des résultats encourageants ont pu être obtenus récemment avec l'utilisation d'une souche de *Lactococcus lactis* dans le traitement des mammites chez la vache (Klostermann et al. 2008).

Objectifs

Le projet proposé avait pour objectif de **caractériser l'écosystème mammaire bovin** et en particulier **d'isoler et d'identifier les espèces de bactéries lactiques** présentes au sein de cet écosystème. Les écosystèmes microbiens mammaires de **bovins laitiers sains et souffrant de mammites ont été comparés**. La composition en bactéries lactiques est-elle modifiée selon le statut sanitaire de l'animal ? Existe-t-il des **espèces marqueurs d'un écosystème mammaire sain versus déséquilibré chez les bovins** ? **Les bactéries lactiques isolées de l'écosystème mammaire**, en particulier celles qui sont associées spécifiquement à un écosystème « sain », seront ensuite caractérisées de manière à établir leur **potentiel probiotique**.

Dispositif expérimental ou Protocole

Une campagne de prélèvements a été réalisée sur 2 exploitations en partenariat avec le réseau InterBioBretagne au printemps 2012. Des prélèvements ont été réalisés sur 20 vaches, sélectionnées sur la base des comptages de cellules somatiques réalisés mensuellement par le contrôle laitier. Onze vaches avaient des taux de cellules somatiques inférieurs à 300 000 cellules/mL sur la lactation en cours et sur la ou les précédentes et étaient considérées comme « saines ». Neuf vaches présentaient des taux de cellules élevés au cours de la lactation en cours et des précédentes lactations et étaient considérées comme « sujettes aux mammites ».

Après nettoyage du pis, un échantillonnage de l'écosystème du canal du trayon a été réalisé par prélèvement des premiers jets de lait et écouvillonnage de l'entrée du trayon. La population bactérienne du lait de premier jet a été évaluée sur différents milieux. Les échantillons ont été enrichis sur différents milieux de culture favorables aux bactéries lactiques puis ensemencées par étalement sur les mêmes milieux gélosés. Les colonies bactériennes présentant des morphotypes différents ont été purifiés et mises en collection. L'identification de l'espèce bactérienne de ces isolats a été réalisée par séquençage de l'ADN 16S.

Résultats et commentaires

Une charge bactérienne des laits de premier jet plus élevée pour les trayons infectés

Dans les échantillons de 1er jet, la flore mésophile totale est évaluée entre 10 à 4.10^5 UFC/m (Figure 1). Les numérations sur différents milieux de culture sélectifs révèlent une présence importante de staphylocoques (dorés ou non), alors que les lactobacilles et les entérobactéries semblent minoritaires (<50 et <300 UFC/mL respectivement). Il est important de souligner la grande variabilité inter-animale, avec des différences de plusieurs $\log_{10}$ entre vaches pour un même milieu, indépendamment de l'état sanitaire des animaux.

Les données ont été analysées en considérant la répartition des animaux en fonction de leur état sanitaire ou du troupeau auquel ils appartiennent. L'analyse statistique ne révèle aucune différence significative de la charge bactérienne entre les deux exploitations. Par contre, les vaches saines ont des taux plus faibles de flores sur la plupart des milieux.

Bilan de la collecte

La campagne de prélèvement nous a permis de collecter 192 isolats. Sur ces 192 isolats, 135 ont pu être identifiés au niveau de l'espèce et 29 au niveau du genre seulement. Un tri des isolats potentiellement redondants (isolés d'une même vache mais sur différents milieux ou à partir d'un échantillonnage différent (1^{er} jet et ecouvillonnage)) a été effectué de manière à établir, pour chaque vache, la liste des espèces identifiées. Cette sélection a permis de conserver 38 isolats pour les vaches saines et 38 pour les vaches sujettes à mammites (Tableau 1).

Pas d'espèces lactiques marqueurs de l'état sanitaire du trayon

Nous avons ensuite, au sein des vaches saines d'une part et des vaches sujettes aux mammites d'autre part, déterminé l'occurrence de chaque espèce ou genre (Figure 2, Tableau 1). La plupart des espèces identifiées se retrouvent dans les 2 groupes de vaches. Ainsi, nous retrouvons une majorité d'entérocoques (32 % et 26 % des espèces identifiées chez les vaches saines et sujettes aux mammites respectivement) et de streptocoques (24 et 34 % des espèces identifiées chez les vaches saines et sujettes aux mammites respectivement). Les lactobacilles sont également fortement représentés parmi les isolats (21 et 24 % des espèces identifiées chez les vaches saines et sujettes aux mammites respectivement). Des souches de lactocoques (8 et 5 %), coliformes (11 et 8 %) et staphylocoques (5 % et 3 % des espèces identifiées chez les vaches saines et sujettes aux mammites respectivement) ont été isolées dans une moindre mesure.

En conclusion, la composition, d'un point de vue qualitatif, en flores lactiques (lactocoques, lactobacilles, enterocoques, streptocoques) ne semble pas fortement altérée chez les vaches sujettes aux mammites. En particulier, les lactobacilles connus pour exercer un rôle probiotique dans d'autres écosystèmes sont présents dans les 2 types d'écosystème. De même, l'espèce *Streptococcus uberis*, un des principaux agents responsables de mammites, est présente dans les deux types d'écosystèmes. L'analyse au niveau de l'espèce révèle toutefois une légère différence : en effet, des isolats correspondant à *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis* ont été isolés chez des vaches sujettes aux mammites alors que ces espèces ne sont pas retrouvées chez les vaches saines. Cette observation demande à être validée sur un plus grand échantillonnage, le nombre d'isolats correspondant à ces 2 espèces étant très limité. Nos

travaux ne permettent donc pas de faire ressortir, à l'heure actuelle, d'espèces de flores lactiques marqueurs de l'état sanitaire. Toutefois, il est important de noter ici qu'il s'agit d'une comparaison qualitative (les mêmes espèces sont retrouvées chez les vaches saines et sujettes aux mammites) mais non quantitative (les bactéries lactiques ont été isolées après enrichissement sur milieux sélectifs). Les proportions des différentes espèces ne sont peut-être pas conservées.

Conclusion/Perspectives

Cette campagne de prélèvement a permis de collecter 192 isolats du trayon de vaches. L'analyse qualitative de ces isolats n'a pas permis de conclure à l'existence de flores lactiques marqueurs de l'état sanitaire de l'animal (sain ou sujet aux mammites). Toutefois, si les espèces retrouvées sont les mêmes, il est possible que les proportions de ces différentes espèces soient modifiées en fonction de l'état sanitaire. La caractérisation de l'écosystème mammaire bovin se poursuit actuellement dans le cadre d'un projet du métaprogramme INRA MEM (Métagénomique et Ecosystèmes Microbiens) intitulé « Milk Ecosystem and Udder Health » (Ecosystème du lait et santé de la mamelle). Ce projet explore la composante bactérienne de l'écosystème mammaire bovin par une approche métagénomique, ce qui devrait nous apporter des éléments de réponses sur la composition qualitative et quantitative de l'écosystème en lien avec l'état sanitaire du trayon.

D'autre part, parmi les isolats collectés, nous avons retenus les 22 souches de lactocoques et lactobacille pour poursuivre nos travaux. L'évaluation du potentiel probiotique de ces souches est en cours (capacité à inhiber la croissance des pathogènes responsables des mammites (*E. coli*, *S. aureus*, *S. uberis*), à inhiber la colonisation du tissu mammaire, à stimuler le système immunitaire).

Contacts :

Sergine Even, Damien Bouchard, Yves Le Loir

Rédigé d'après les travaux de **Taous Saraoui** (stage de Master 2) et **Damien Bouchard** (Doctorant)

UMR 1253 INRA - Agrocampus Ouest

STLO Science et technologie du lait et de l'œuf

Tél. : 02 23 48 59 44

email : Sergine.Even@rennes.inra.fr

site web : www.rennes.inra.fr/stlo

Tableau 1. Distribution des isolats de vaches saines et sujettes aux mammites

Nombre d'isolats de	vaches sujettes aux mammites	%	vaches saines	%
enterobactéries	3	8%	4	11%
<i>Escherichia coli</i>	3	8%	3	8%
<i>klebsiella oxytoca</i>			1	3%
enterocoques	10	26%	12	32%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	3%		
<i>Enterococcus faecium</i>	3	8%	4	11%
<i>Enterococcus hirae</i>	2	5%	2	5%
<i>Enterococcus sp</i>	4	11%	6	16%
lactobacilles	9	24%	8	21%
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	8%	1	3%
<i>Lactobacillus casei</i>	2	5%		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	11%	7	18%
lactocoques	2	5%	3	8%
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	3%	3	8%
<i>Lactococcus lactis</i>	1	3%		
staphylocoques	1	3%	2	5%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3%		
<i>Staphylococcus sp</i>			2	5%
streptocoques	13	34%	9	24%
<i>Streptococcus infantarius</i>	7	18%	6	16%
<i>Streptococcus parauberis</i>			1	3%
<i>Streptococcus uberis</i>	3	8%	1	3%
<i>Streptococcus sp</i>	3	8%	1	3%
total	38	100%	38	100%

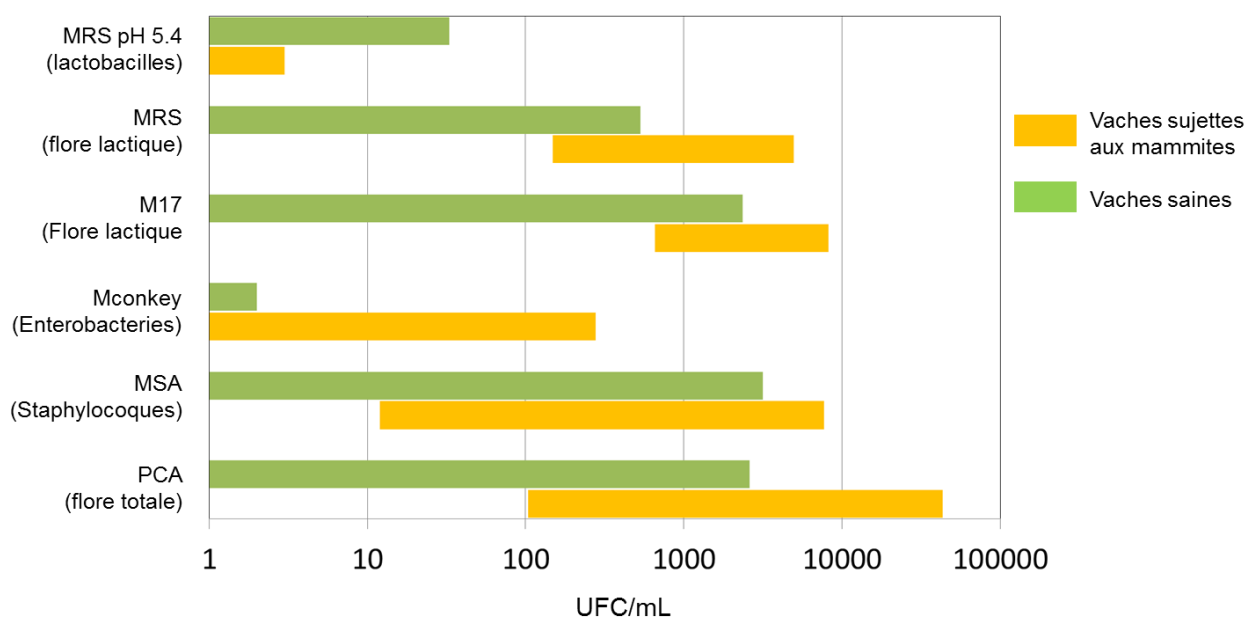


Figure 1: dénombrement de la flore bactérienne des laits de premier jet pour les vaches sujettes aux mammites et les vaches saines. Les barres indiquent la gamme de dénombrement sur chaque milieu. PCA : milieu non sélectif permettant d'évaluer la flore totale; MSA : milieu sélectif pour les staphylocoques; Mc Conkey : milieu sélectif pour les enterobacteries (*E. coli* par ex); M17 et MRS: milieux favorables à la croissance des bactéries lactiques; MRS pH 5.4: milieu sélectif pour les lactobacilles.

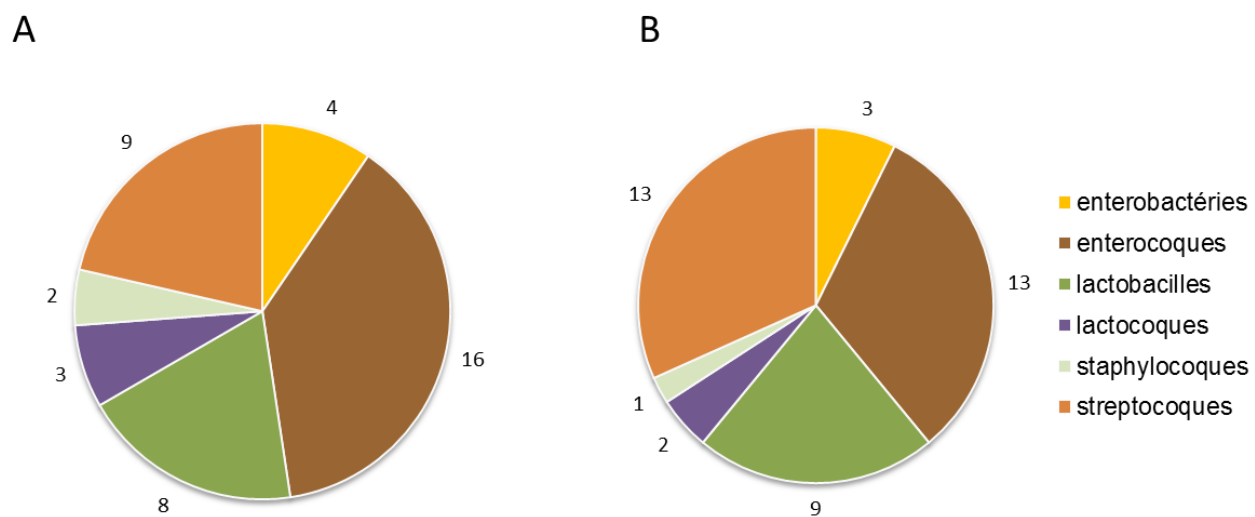


Figure 2 : Distribution des isolats de vaches saines (A) et sujettes à mammite (B).

ANNEXE 3

Chapitre de livre en cours de publication

**Lactic acid bacteria to modulate virulence
expression in pathogenic bacteria :**

« an alternative to killing ? »

Sergine Even, Damien Bouchard and Yves Le Loir

Lactic acid bacteria to modulate virulence expression in pathogenic bacteria: an alternative to killing?

Sergine Even, Damien Bouchard and Yves Le Loir

INRA, UMR1253 STLO F-35042 Rennes, France

Agrocampus Ouest, UMR1253 STLO F-35042 Rennes, France

Abstract

In some contexts where Lactic Acid Bacteria (LAB) belong to the normal dominant microbiota, such as in the intestinal or vaginal ecosystems, pathogenic bacteria sometimes colonize, persist, express virulence factors and induce infections.

Studies on the interactions between LAB and pathogens began a few decades ago and were pursued to shed light on the inhibitory capabilities that LAB might have on growth and/or toxin production in these ecosystems.

This chapter provides an up-to-date look at the current hypotheses of the mechanisms involved in the inhibition of pathogens by LAB in various ecosystems. Such inhibition does not only rely on a growth inhibition of the targeted pathogens by killing. It might also rely on LAB capabilities to impair colonization, to displace the pathogens from the ecosystem and/or to inhibit virulence expression. All these phenomena do not imply killing of the pathogen but rather involve LAB capacity to exert a barrier effect, to modulate virulence expression, and somehow to influence the fate of host-pathogen interactions when they cross the fuzzy line which separates a commensal relation with the host from a pathogenic one. Further works in this field will open up new avenues for methods of biocontrol by LAB and/or for biotechnological uses of LAB-compounds to fight against various bacterial (or fungal) pathogens. In other words, it might lead to the finding of microbial solutions to microbial problems.

Introduction.

Some opportunistic human pathogens can be found in the endogenous ecosystems (e.g. retronasal, mammary, intestinal, or vaginal) of the Human host and adopt a commensal lifestyle therein (Reid and Bruce 2006). Other pathogens transiently colonize, invade the host's tissues and/or produce virulence factors and thus exert adverse effects on host health. In both cases, probiotic lactic acid bacteria (LAB) can be envisioned as natural killers of pathogenic microorganisms through the production of bacteriocins (see Chapter by E. Tsakalidou), oxygen peroxide or other deleterious compounds. Although some bacteriocins display high specificity of spectrum, the killing activity of some other molecules not always proves to be selective. Therefore to complement these weapons, recent studies therefore highlight the beneficial effects of probiotic LAB through their capability to impair and or modulate adhesion, invasion or virulence expression in targeted pathogens. Such effects on these early important steps of the infection are of main importance and refer to prevention strategies. Other studies also report the ability of LAB to treat, notably through their capacity to neutralize toxins, either by degradation or titration.

Many studies report overall beneficial effects of probiotic LAB on host health in vaginal or intestinal contexts. However, our comprehension of the underlying mechanisms is still limited. It is difficult to investigate such mechanisms *in vivo* nevertheless using animal models, cell cultures, and *in vitro* assays, recent works began to shed light on the molecular basis of these probiotic effects. Such investigations increase our knowledge on probiotics, and help us setting up parameters for the screening of probiotic candidates.

In this chapter, we will review the potential of LAB to inhibit or modulate adhesion, invasion, and virulence expression, facilitating the clearance of pathogen without necessarily killing it. We will focus on recent advances and works investigating the mechanisms underlying this particular probiotic potential.

1.Competition for a niche

Many pathogens are able to invade the host tissues. This capability, called invasiveness, relies on mechanisms for colonization (adherence and multiplication), production of extracellular substances, invasion of tissues and ability to overcome or bypass host defense. LAB can modulate the expression of host's genes (e.g. immune response, mucus synthesis). These aspects are reviewed in this book (see chapter by O'Flaherty). LAB can also

interfer with pathogen invasiveness by modulating and or impairing the colonization and invasion of the host tissues as shown in both vaginal and intestinal contexts. The various modes of competition for a niche include interaction with the pathogen before it interacts with host cells (co-aggregation) and competition during the process of interaction with host cells (exclusion, competition, displacement) (Figure 1). The following paragraphs illustrate these capacities against some of the most frequent bacterial pathogens in each context.

1.1. Modulation of adhesion capacities

Adhesion is a primordial step in the host colonization by most pathogenic microorganisms in niches like the vaginal or the gut ecosystems. Probiotic LAB have been investigated for their capability to diminish the adhesion of pathogenic microorganisms to the vaginal or intestinal mucosae. Such objective can be achieved by acting on the mucosae (by stimulating more mucus production, by competing for adhesion sites) or by acting on the pathogens themselves (inhibition or modulation of the adhesion). Such modulation capabilities have been reported in both vaginal and intestinal context.

Vaginal context.

In healthy women producing estrogen or receiving estrogen supplementation, the vaginal bacterial flora is dominated by *Lactobacillus* species present at levels of 10^7 - 10^8 CFU/g of fluid. These Lactobacilli reportedly play a major role in maintaining urogenital health (Reid and Bruce 2006). Special attention has been paid to the inhibition of adhesion exerted by probiotic strains, isolated from healthy vaginal flora, against pathogens frequently associated to urogenital infections (Table 1).

There is indeed evidence that *Lactobacillus* species like *L. acidophilus* can inhibit the attachment of uropathogenic *E. coli* to various surfaces (Velraeds et al. 1998). They can even displace uropathogenic *E. coli* biofilm as shown for *L. rhamnosus* (McMillan et al. 2011). Similarly, some strains of *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus reuteri* were tested on human epithelial cervical cells and were shown to be capable of reducing adherence of *Neisseria gonorrhoeae*, a human specific pathogen that colonizes the urogenital tract and causes gonorrhea (Vielfort et al. 2008). In another study, Spurbeck and Arvidson showed that *Lactobacillus jensenii*, *L. gasseri* ATCC 33323, or *L. gasseri* ATCC 9857 reduced gonococcal adherence by nearly 50 % when epithelial cells were precolonized by lactobacilli. Furthermore, lactobacilli were able to displace adherent gonococci from epithelial cells, suggesting that these organisms are efficient either as prophylactic or as therapeutic treatment (Spurbeck and Arvidson 2008). Co-aggregation (Figure 1) of

lactobacilli with pathogens is one mechanism that can be hypothesized to explain such inhibition. *L. reuteri* can indeed strongly coaggregate with *S. aureus* strains that produce TSST-1, a potent toxin associated to vaginal cases of toxic shock syndrome, as recently shown and measured by atomic force microscopy (Younes et al. 2012).

Intestinal context.

LAB can compete with pathogens for adhesion and colonization on the mucosal surfaces. This competition is one of the possible protective mechanisms that probiotic LAB can exert in the intestinal context (Gueimonde et al. 2006). Several *in vitro* studies report the adhesion and competitive inhibition of enteropathogenic bacteria by probiotic LAB tested alone or in combination. Such studies were carried out on cell cultures (intestinal cell lines) and or intestinal mucus.

The adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus was shown to be inhibited by specific probiotic LAB. In this case, various probiotic strains (*Streptococcus thermophilus* NCC 2496, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461, *Bifidobacterium longum* NCC 3001 and *Bifidobacterium lactis* NCC 2818) were tested alone or in combination and they demonstrated both inhibition and displacement of the adhered *E. sakazakii* strains leading to a competitive exclusion (Collado et al. 2008). More recently, *L. gasseri* strains were also shown to be able to significantly compete with, displace, and inhibit the adhesion to intestinal mucus of *E. sakazakii* and *C. difficile*, another enteropathogen (Ferreira et al. 2011). In all these cases, it seems that coaggregation capacities of the probiotic LAB with the enteropathogens are involved in the inhibitory effect.

Live *Lactobacillus salivarius* CICC 23174, and *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1.557, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 were shown to competitively exclude *S. aureus* in adhesion tests on Caco-2 cells. This inhibition likely involves cell surface properties, like hydrophobicity, autoaggregation, and coaggregation ability that are shared by the *Lactobacillus* strains tested. The phenomenon was however dependent on the bacterial status (cell concentration, growth phase) and co-incubation conditions (Ren et al. 2012). Similar properties are likely involved in the inhibition exerted by some *Lactobacillus kefir* strains which coaggregate *Salmonella* and significantly decrease its capacity to adhere to and to invade Caco-2/TC-7 cells. In this case, S-layer proteins are suspected to play a protective role against adhesion and invasion (Golowczyc et al. 2007).

Competitive adhesion of the probiotic LAB to the intestinal mucus is one of the properties involved in the exclusion of pathogens. The molecular mechanisms involved in the

LAB adhesion to mucus is starting to be elucidated as shown with the recent discovery of pili structures in the probiotic *L. rhamnosus* GG that confer on the cells a mucus-binding activity (Kankainen et al. 2009, Reunanen et al. 2012). More generally, genetic determinants involved in the adhesion of Lactobacilli to the cell surface are well-explored and several genes can now be screened for to select probiotic candidates. These genes encode proteins that are directly involved in adhesion such as mucus binding proteins (*mub1* and *mub2*), mucus adhesion promoting protein (*mapA*), mannose-specific adhesin (*msa*), glucan synthase (*gtf*), fibronectin-binding protein (*fpbA*), collagen-binding protein (*cnb*), collagen-binding S-layer (*cbsA*) or aggregation-promoting factors (*apf*). Some house-keeping genes were also shown to be involved in adhesion: elongation factor Tu (*ef-Tu*), enolase (*eno*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gap*), heat shock protein 60 (*groEL*), and sortase (*srtA*) (Turpin et al. 2012).

1.2. Modulation of invasion capacities

The invasion of the host tissues most often involves the production of bacterial extracellular substances which help the microbial pathogen breaking down host defenses. Most of these substances are proteins that act as lock-and-key bonds with complementary molecules at the surface of host cells. They can also have enzymatic activities that act locally to damage the tissues. At the level of ecological niches like the gut or the vagina, pathogens have to face hostile environmental factors that they must overcome for the onset of an infection. These environmental factors include physiological activities of the host like peristalsis, mucus production, bile salts, organic acids, antimicrobial peptides and defensins... coupled with the presence of an endogenous ecosystem. All these factors constitute substantial obstacles to any pathogen. Some of the most important pathogens are (obligate or facultative) intracellular pathogens (e.g. *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*). Their capacity to invade host cells is a key step in the infection process and or in their persistence in the host tissues. LAB capability to hinder pathogens' invasion is thus often tested, especially in probiotics against intestinal pathogens.

Vaginal context

On one hand, many urogenital pathogens are intracellular pathogens (e.g. *Mycoplasma genitalium*, *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, uropathogenic *E. coli*). On the other hand, there is an abundant literature about vaginal probiotics. However, there are almost no reports about the capacity of such vaginal probiotics to interfere with pathogens' invasion in

urogenital host epithelial cells. Spurbeck and Arvidson adapted a cell culture model of gonococcal infection to examine the effects of lactobacilli on gonococcal interactions with endometrial epithelial cells *in vitro*. In this work, precolonization of the cell cultures with *Lactobacilli* (*L. jensenii*, *L. gasseri* ATCC33323 or ATCC9857) resulted in an inhibition of gonococcal invasion of epithelial cells by more than 60 %. However this inhibition proved to be independent from adhesion mechanisms (Spurbeck and Arvidson 2008).

Intestinal context

Enteropathogen infection can be dramatically modified by intestinal microbes. It is thus tempting to select probiotic LAB and to evaluate their inhibitory potential against various enteropathogens. Such inhibitions mediated by a modulation/inhibition of the invasion capacities have been demonstrated *in vitro* and *in vivo* against some major pathogens.

C. jejuni is a common bacterial cause of enterocolitis in humans where it causes diarrhoea. *Lactobacillus helveticus*, strain R0052 was shown to be able to reduce epithelial cell invasion by *C. jejuni* *in vitro*, in both human colon T84 and embryonic intestine 407 epithelial cells. *L. helveticus* R0052 adhered to both epithelial cell types, suggesting that competitive exclusion contribute to the inhibition (Wine et al. 2009). Interesting results were also obtained with a *L. acidophilus* strain (ATCC4356), which was shown able to interfere with adhesion/invasion of *C. jejuni* to intestinal Caco-2 cells. Several tests were carried out (exclusion, competition, and displacement tests, see hereafter) and showed that *L. acidophilus* ATCC4356 was able to reduce *C. jejuni* adhesion to Caco-2 cells and invasion, most probably by displacement and exclusion mechanisms (Campana et al. 2012). Mucus producing intestinal cell lines, such as HT29MTXE12 (E12), provides a more realistic *in vitro* model for *C. jejuni* infections. Using the E12 cells, it was shown that the probiotic strains *L. rhamnosus* R0011, *L. helveticus* R0052, *L. salivarius* AH102, *B. longum* AH1205, used alone or in combination, were able to colonize E12 mucus and to bind to underlying cells. These probiotic LAB strains attenuated *C. jejuni* adhesion to and invasion of E12 cells. Live bacteria and prolonged precolonization of E12 cells with these probiotics were necessary for the inhibitory action (Alemka et al. 2010). Altogether these studies establish the potential efficacy of probiotics for the prevention and attenuation of *C. jejuni*-related disease in humans.

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) was first described in 1983 as “hamburger disease”, due to its association with beef consumption in a fast food chain. It has later been associated to different food products and was proved responsible for several epidemic events, such as the large outbreak reported in Germany in 2011, traced back to consumption of contaminated sprouts (Muniesa et al. 2012). As an emerging and serious

threat, EHEC now holds public attention. In humans, infection by EHEC may result in combinations of watery diarrhoea, bloody diarrhoea, and hemolytic uremic syndrome (HUS) (Gyles 2007). Probiotics can hinder pathogenesis either by modulating the *E. coli* invasion capacities or by inhibiting Shiga toxin production (or attenuating its effects) or both. *Lactobacillus* strains (*L. reuterii*, *L. gasseri*, and *L. plantarum*), which are able to attach to HT29 cells were tested for aggregation with several *E. coli* strains (including O157:H7). *L. reuterii* showed the highest adhesion capacity onto HT29 and also showed the strongest ability to aggregate with *E. coli*. Furthermore, invasion of the cell line by *E. coli* was markedly suppressed by *L. reuterii*, while *L. gasseri* and *L. plantarum* caused only a minimum anti-invasion effect (Bujnakova and Kmet 2012). Positive effects of *L. reuterii* were recently demonstrated *in vivo*, in a mouse model. A probiotic *L. reuteri* (ATCC PTA 6475) is indeed effective in suppressing disease symptoms caused by EHEC in germ free Swiss Webster mice monocolonized with an EHEC strain (Eaton et al. 2011).

Salmonella is the first causative agent of food-borne poisoning outbreaks leading to diseases, in humans, that range from mild gastroenteritis to enteric fever, depending on the serovar. Many studies were conducted to evaluate the probiotic potential of LAB against this major pathogen and showed that many Lactobacilli strains can exert a positive effect against *Salmonella* infections through a variety of mechanisms. Like EHEC, *Salmonella* Typhimurium can adhere to epithelial cells and destroy cell junctions. *Lactobacillus amylophilus* D14 was tested on Caco-2 cells against the invasion of enterotoxigenic *E. coli* K88 and *Salmonella* Typhimurium SL1344 and was shown to increase the expression and to ameliorate the distribution of tight junction proteins, protecting thus the mucosal barrier (Yu et al. 2012). Similarly, a *L. delbrueckii* ssp. *lactis* strain (strain R4) was shown to prevent damages to tight junctions induced by *Salmonella* Typhimurium (Yu et al. 2012). Protective effects can also be mediated by the modulation of the host immune response as shown after oral administration of *L. casei* CRL 431, which induces variations in the cytokine profile and in the toll-like-receptors (TLRs) expression when administered both prior and after the challenge with *Salmonella* Typhimurium (Castillo et al. 2011). The mechanisms involved in these positive effects are still poorly understood. However, promising and recent findings showed that effector(s) secreted by some lactobacilli are responsible for some effects. Product(s) secreted by Lactobacilli were indeed shown to modify *Salmonella* invasiveness. *L. acidophilus* LB culture supernatants contain heat stable and low molecular weight molecules that cause rapid depolarization of the *Salmonella* Typhimurium cytoplasmic membrane

without affecting bacterial viability and the inhibition of swimming motility which altogether retard invasion of Caco-2/TC-7 cell line (Lievin-Le Moal et al. 2011).

Listeria monocytogenes is an intracellular Gram positive pathogen whose invasion mechanism is very well-documented (Cossart and Toledo-Arana 2008). Although many studies report the screening of LAB libraries for the production of bacteriocins active against *L. monocytogenes* in a food (Galvez et al. 2007), or a gut context (see chapter by E. Tsakalidou) in a killing strategy, only few studies investigate the inhibitory potential of LAB against the invasion steps. However, promising results are reported using *Leuconostoc mesenteroides* strain Lnm-1RM3 isolated from *narezushi* (Japanese dish made of a fermented fish with rice). When administered in drinking water, this strain was able to suppress the recovery of the pathogen from the spleen of A/J mice orally infected with *L. monocytogenes*. This strain also shows an inhibitory effect against *L. monocytogenes* invasion into Caco-2 cells (Nakamura et al. 2012).

Another recent and interesting work comprehensively analyzed the impact of two lactobacilli strains (*L. paracasei* CNCM I-3689 and *L. casei* BL23), on *L. monocytogenes* and orally acquired listeriosis in a gnotobiotic humanized mouse model (Archambaud et al. 2012). A treatment with these Lactobacilli strains modulates *L. monocytogenes* infection, which correlates with dramatic changes in *L. monocytogenes* transcriptome and with a decrease in the expression of IFN-stimulated genes and some microRNAs.

Since pathogens like *Listeria* are very well-equipped for adhesion to and invasion of host cells, their own adhesion proteins can be cloned and expressed in recombinant probiotic LAB as exemplified recently with a probiotic *L. paracasei* expressing a *Listeria* adhesion protein. This recombinant probiotic LAB was found more efficient to prevent *L. monocytogenes* adhesion, invasion, and transwell-based transepithelial translocation in a Caco-2 cell culture model than several wild type probiotic bacteria (Koo et al. 2012).

1.3 Modulation of adhesion and invasiveness by probiotic LAB in other contexts.

The potential application of probiotic LAB in contexts other than gastrointestinal or urogenital disease prevention has also attracted the attention of some research teams. This is the case for LAB used in oral health or, in more prospective studies, in mammary health.

In oral health, only few clinical studies have been conducted so far. However, the results suggest that probiotic LAB could be used in preventing and treating oral infections, like dental caries, periodontal disease and halitosis. Several species of Lactobacillus are found

in saliva samples in humans (*L. acidophilus*, *L. casei*, *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. salivarius*) and *Lactobacillus sp.* account for about 1 % of the cultivable oral microflora. Selection criteria for oral probiotics include binding to dental surface, production of antimicrobial compounds against oral pathogens, alteration of environmental conditions of the mouth and reduction of inflammatory conditions (Bonifait et al. 2009). Some lactobacilli are able to inhibit the growth of pathogens involved in periodontitis or gingivitis. Moreover, lactobacilli, particularly *Lactobacillus gasseri* and *L. fermentum*, are more frequent in the oral cavity among healthy persons compared to persons suffering from chronic periodontitis (Koll-Klais et al. 2005). Oral probiotics like *L. reuteri* (strains DSM 17938 and ATCC PTA 5289) may have some beneficial effects on oral malodour assessed by organoleptic scores (Keller et al. 2012). Similar results were reported using *Lactobacillus salivarius* WB21 (Iwamoto et al. 2010). Several studies investigated the effects of oral probiotics against dental plaque formation. Some oral probiotics like *Lactobacillus reuteri* were shown to persist in salivary biofilm microcosms in *in vitro* models, yet, with no marked bacterial inhibition versus colonization of streptococci and Gram-negative anaerobes (Madhwani and McBain 2011). Similarly, the growth of *S. mutans* and *S. sobrinus*, two important cariogenic streptococci, was shown to be inhibited by *L. rhamnosus* GG and *L. casei in vitro* (Meurman et al. 1995, Nase et al. 2001).

Other studies investigate the efficacy of oral probiotics such as *Streptococcus salivarius* K12 against streptococcal pharyngitis and/or tonsillitis. *S. salivarius* K12 is able to colonize the oral cavity and to inhibit *Streptococcus pyogenes* growth. It was shown able to reduce the number of episodes of infections in adults suffering from recurrent oral streptococcal pathology (Di et al. 2013). Similarly, *S. salivarius* K12 was shown to reduce episodes of acute otitis in children (Di et al. 2012).

Although promising results are now reported on potential oral probiotics, more studies are required for the identification of the probiotics that are best suited to oral use among gastrointestinal probiotic strains or in the indigenous oral microbiota (adapted to the oral ecosystem). In parallel, appropriate vehicles have to be tested: food products (cheese, milk, yogourt) or supplements (chewing gum).

In mammary health, the use of probiotic LAB (mammary probiotics) appears as an appealing strategy and an alternative or complement to antibiotic treatment for the management of mastitis. Mastitis is indeed an inflammation of the mammary gland that most

often has an infectious origin (involving staphylococci, streptococci or coliforms). It is a common disease during lactation in both lactating mothers and dairy ruminants (cows, ewes, goats). Staphylococcal mastitis is especially difficult to treat and prone to recurrence. This is due to the emergence of antibiotic resistance, to *S. aureus* capacity to form biofilms and/or to its ability to invade the host mammary cells. Mastitis is thus a huge problem both in human (reasons to give up breastfeeding) and in veterinary medicine (huge economical loss in milk production (Le Maréchal et al. 2011)). In two recent studies was shown that women with infectious mastitis who orally received Lactobacilli (*L. fermentum*, *L. gasseri* and/or *L. salivarius*) originally isolated from breast milk recovered more rapidly and had lower recurrence of mastitis than the group of women whose mastitis was treated with antibiotics (Arroyo et al. 2010) or those who received the excipient (Jimenez et al. 2008). Despite efforts dedicated to the identification of LAB strain isolated from the human milk, little is known, to date, about the mechanisms involved in such beneficial effects. Recent genome sequencing of some human milk LAB isolates might improve our understanding of the molecular basis of these phenomena (Jimenez et al. 2010, Jimenez et al. 2012, Martin et al. 2012). Positive effects of probiotic LAB were also observed in dairy cows, with the use of *Lactococcus lactis* strain DPC3147, which was shown as efficient as an antibiotic treatment in preventing or treating experimentally induced mastitis in lactating cows (Crispie et al. 2008). The beneficial effect of such intramammary infusion was investigated *in vivo* and was shown to stimulate the immune response (especially IL-1beta and IL-8 gene expression) in the mammary gland (Beecher et al. 2009). Recently, Bouchard et al., showed that 3 *L. casei* strains were able to inhibit *S. aureus* adhesion and invasion *in vitro*, in mammary epithelial cells (Bouchard et al. 2013). The use of properly selected probiotic LAB thus appears to be a promising alternative to antibiotic therapy for the treatment of infectious mastitis both in human and veterinary medicine.

2. Modulation of virulence

The use of LAB to fight against pathogenic bacteria does not only rely on their capacities to compete for niches including host tissues. Alternatives to killing or competition for niches are presented in this second part of the chapter, which all deal with modulation of virulence. This modulation of virulence includes inhibition of expression of virulence factors or related regulators, but also a direct effect on virulence through, for instance, toxin titrations (Table 2, Figure 2).

2.1. Modulation of virulence expression: toxins and regulators

Only few studies reports antagonistic effects of LAB on virulence expression of pathogenic bacteria. Indeed, such effects have been mostly reported, and looked for, in contexts where a complex and balanced ecosystem has to be maintained, such as vaginal or intestinal ecosystems. In these contexts, a non-specific and large scale treatment such as antibiotherapy may cause important damages on ecosystem composition including removal of positive microflora. Targeting virulence factors responsible for infection acuteness such as toxins may be much more respectful of the ecosystem, resulting in the maintenance of its barrier effect against pathogens. This part will mainly focus on interaction of LAB with 3 major human pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* and *Escherichia coli* in intestinal and/or vaginal contexts.

LAB interference with *S. aureus* quorum sensing and toxin production

S. aureus is an opportunistic pathogen naturally present in the nasal cavity and the skin of humans and warm-blooded animals (Kluytmans and Wertheim 2005). From an epidemiological view point, it is a major pathogen responsible for infections ranging from superficial skin infections to life-threatening septicaemia, endocarditis and osteomyelitis. Its capacity to cause such a differentiated panel of infections is consistent with its ability to express a large number of virulence factors and to acquire several antibiotic resistance determinants, raising *S. aureus* among the most prevalent agents involved in nosocomial infections. There is thus a need to identify new antistaphylococcal agents and preventive strategies.

In 2002, Gan et al described the successful use of a probiotic, *Lactobacillus reuteri* RC-14 (formerly *Lactobacillus fermentum* RC-14) to inhibit surgical implant infections caused by *S. aureus* (Gan et al. 2002). This was partly related to *L. reuteri* RC-14 ability to secrete a biosurfactant which significantly inhibited *S. aureus* adherence to the implant. To elucidate the mechanisms involved, communication between the two bacterial species was further investigated using a co-culture apparatus that physically separates the two species, while allowing the passage of soluble compounds (Laughton et al. 2006). The presence of *L. reuteri* RC-14 dramatically decreased the expression of the staphylococcal superantigen-like protein 11 (SSL11) in *S. aureus* strain Newman as confirmed by 2D gel electrophoresis and *gfp*- and *lux*-reporter systems. This may explain, at least in part, the attenuated ability of *S. aureus* to cause infection in the rat surgical-implant model. In addition to the repression of SSL11

expression, *L. reuteri* RC-14 supernatant was able to interfere with the *agr* system, one of the main virulence regulator in *S. aureus* (Novick et al. 1993, Yarwood and Schlievert 2003), which controls the time-course expression of virulence factors in relation with growth phase, allowing a shift from adhesion factors to exoprotein and toxin production. Hence, small molecules contained in *L. reuteri* RC-14 supernatant were able to repress the expression of RNAPIII, the *agr* effector (Laughton et al. 2006). *L. reuteri* RC-14 is a human vaginal isolate (Reid et al. 1987), and as such, its ability to interfere with virulence expression of a prototype of menstrual toxic shock syndrome (TSS) *S. aureus* strains, namely MN8, was also investigated (Li et al. 2011). Production of staphylococcal superantigen toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) is believed to be the main cause of menstrual-associated TSS. TSST-1 promotes nonspecific activation of T cell proliferation, resulting in massive cytokine release that is believed to be responsible for the most severe features. Supernatants of *L. reuteri* RC-14 were able to inhibit production of TSST-1, as well as the *agr* system, without any effect on growth. Repression of *tst* expression was in part independent from the repression exerted on the *agr* system. Modulation of the expression of two other virulence-associated regulators *sarA* and *saeRS* was also observed. Hence, *L. reuteri* RC-14 was able to affect the overall expression of virulence factors in *S. aureus*, as confirmed on 1D-PAGE electrophoresis by the lower production of exoproteins in *S. aureus* MN8 grown with an *L. reuteri* RC-14 supernatant. The cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Tyr-L-Pro) were identified as the signaling molecules responsible for this downregulation of virulence by *L. reuteri* RC-14 (Li et al. 2011). Bioactive cyclic dipeptides (also known as 2,5-diketopiperazines, or DKPs) are produced by several gram negative bacteria but also by some gram positive bacteria such as *Lactobacillus plantarum*. DKPs have been previously shown to possess antifungal properties (Strom et al. 2002) and also to interfere with quorum sensing in gram negative bacteria (Holden et al. 1999), suggesting they may constitute a general mechanism of interspecies communication.

Interference of LAB with quorum sensing and toxin production in *S. aureus* was also observed by our research group. Hence, *Lactococcus lactis* was found to alter the expression of several staphylococcal virulence factors including the *agr* system and some enterotoxins - which are responsible for staphylococcal food poisonings- when cultivated in a mixed culture on chemically defined medium, but also in a model cheese matrix (Cretenet et al. 2011, Even et al. 2009). In that case, downregulation of RNAPIII expression was not mediated by the

release of a stable soluble factor in the medium, but rather required the presence of *L. lactis* (Even et al. 2009).

LAB as an alternative or complementary treatment to *Clostridium* associated intestinal infections

C. difficile is the leading cause of hospital-acquired diarrhoea and it has even surpassed methicillin-resistant *S. aureus* as the first cause of hospital-acquired infections in some areas of the USA (Musgrave et al. 2011). *C. difficile*-associated diarrhoea (CDAD) vary from mild diarrhoea to fulminant colitis and death. These syndromes are due to the production of 2 toxins, namely Toxin A and B. In normal conditions, *C. difficile* colonization and toxin production are inhibited by the resident microbiota however this barrier effect is strongly altered in patients undergoing long-time antibiotic treatments (Aslam et al. 2005, Borriello 1990, Viscidi et al. 1981). *C. difficile* acute infections are treated by antibiotherapy but they tend to relapse in 20-25 % of patients (Musgrave et al. 2011). In addition, due to the dissemination of a hypervirulent and epidemic clone (NAP1) and to the appearance of antibiotic resistant *C. difficile* strains (Bouza et al. 2005, O'Connor et al. 2009), rate and severity of *C. difficile* infections are still increasing (Musgrave et al. 2011, O'Connor et al. 2009). There is thus a need for alternative strategies to fight *C. difficile* infections. These strategies should be more respectful to the normal gut flora, such as development of immune response molecules, toxin traps or probiotics (for recent reviews, see (Musgrave et al. 2011, Parkes et al. 2009).

The use of probiotics as an alternative has been investigated for primary and secondary prophylaxis against CDAD, with varying success depending on patients groups (Bouza et al. 2005, Parkes et al. 2009). LAB were shown to prevent *C. difficile* colonization, through inhibition of growth and/or adhesion (Naaber et al. 2004). More interesting, a recent study also reported the ability of *Streptococcus thermophilus* to inhibit the production of toxin A by *C. difficile* (Kolling et al. 2012). Apart from any bactericidal effect, lactic acid containing supernatants of *S. thermophilus* (10mM) were found to inhibit *tcdA* expression and TcdA secretion. *In vivo*, in a murine model of *C. difficile* infection, mice treated with viable *S. thermophilus* exhibited reduced diarrhoea and weight loss as compared to untreated mice and the toxin levels in cecal contents tended to be lower (Kolling et al. 2012). This was also correlated to a higher level of lactate in the cecum following oral administration of viable *S. thermophilus* while the abundance of *C. difficile* was lower. Altogether, these data suggested

that *S. thermophilus* antagonistic effect on *C. difficile* infection relied, at least in part, on lactate production although inhibition of *C. difficile* growth and Toxin A production cannot be discriminated *in vivo*.

Similar effects have been reported with *Clostridium perfringens*, a member of the normal gut flora, but also a major cause of intestinal disease in animals and, to a lesser extent, in humans (Petit et al. 1999). These gastrointestinal disorders are due to the production of toxins, each toxin type being associated with specific diseases in various animal species and in humans (Songer 1996). Prolonged antibiotic use is related to an altered composition of the normal intestinal flora which favors the proliferation of *C. perfringens* and increases the risk of toxin production at gut level. In addition to the four major toxins, *C. perfringens* may carry other toxin-encoding genes, including *cpb2*, the gene which encodes the beta2 toxin (Gibert et al. 1997). The presence of *C. perfringens* carrying *cpb2* in the intestine has been associated with intestinal disease in humans, ruminants, horses, and pigs although carriage was also reported in healthy animals and humans (Bueschel et al. 2003). In an attempt to investigate communication between beneficial and pathogenic bacteria in the gut microbiome, i.e. *Lactobacillus fermentum* and *C. perfringens*, Allaart et al. (2011) performed *in vitro* co-cultures of these two species. *L. fermentum* was able to inhibit *cpb2* expression and, as a result, beta2 toxin production by *C. perfringens* without any effect on bacterial viability, and this was most likely due to acidification. Whether such communication occurs *in vivo* still remains to be proved (Allaart et al. 2011).

Downregulation of EHEC Shiga toxin expression by LAB probiotic strains

Bloody diarrhoea and HUS are attributable to Shiga toxin (Stx) release by decaying EHEC. Two major Shiga-toxin types exist, Stx1 and Stx2, whose genes are bacteriophage encoded. The induction of these temperate phage increases *stx* gene copies and, as a result, *stx* gene expression. Several strategies are currently under investigation to counteract this pathogen, including antibiotherapy but also strategies specifically targeting Stx toxins, due to their major role in pathogenicity. This latter includes passive immunization with antibodies against Stx-1 and 2, toxin trap using receptor decoys mimicking the Gb3 cellular receptor for Shiga toxin, as well as probiotics (for a recent review, see Munieza)(Muniesa et al. 2012). Interesting results have been obtained with *Bifidobacterium* and also with LAB (Carey et al. 2008, Eaton et al. 2011). In particular, the effect of LAB strains on *stx2A* expression in *E. coli* O157:H7 (EDL 933) was investigated *in vitro*, during co-incubation with sub-lethal

concentrations of each probiotic strain (Carey et al. 2008). Several *Lactobacillus* and *Pediococcus* species isolated from farm animals, dairy, and human sources were tested including *L. rhamnosus* GG, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. jensenii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *P. acidilactici*, *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*. Co-cultures with all the tested LAB strains led to downregulation of *stx2A* expression, as a result of pH decrease (Carey et al. 2008). Low pH indeed prevents phage induction (Imamovic and Muniesa 2012). Likewise, attenuation of EHEC virulence was reported *in vivo*: a dairy matrix containing *Lactobacillus acidophilus* La5 cell-free spent medium (LAla-5AF) was found to exert a protective effect against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice (Zeinhom et al. 2012). Clinical signs and EHEC colonization rate were significantly attenuated when mice were fed for 4 days with yogurt supplemented with LAla-5AF prior to challenge test with a single dose (10^7 CFU per mouse) of *E. coli* O157:H7. Mechanisms involved in this attenuation of clinical signs are not fully understood and might result from a combination of *L. acidophilus* supernatant effects on growth, colonization, and virulence expression. At least, this supernatant was found to down-regulate the expression of several virulence genes of EHEC *in vitro*, including *stxB2*, *qseA*, *luxS*, *tir*, *ler*, *eaeA*, and *hlyB*, as demonstrated by real-time PCR (Zeinhom et al. 2012).

2.2. Inhibition of toxin activity: degradation, trap or decoy

The above section clearly points out that virulence factors such as toxins generally play a crucial role in infection severity, as illustrated with *C. difficile* or *E. coli*. Thus they often represent key targets for new therapeutic development. Once toxins are expressed and produced, they have to be inhibited. Their degradation or trapping through the development of receptor decoys constitute relevant strategies to counteract their cytotoxicity. This part will focus on the ability of LAB to attenuate virulence, through a direct effect on toxin cytotoxicity of the two major intestinal toxin producers described previously, i.e. EHEC and *Clostridium difficile*, and on cytotoxicity of Aflatoxin B1, a major mycotoxin.

Interference of *L. acidophilus* lysates with *E. coli* shiga toxins

As mentioned above, severe infections with EHEC involves the production of one or two shiga-toxins. Attempts to titrate toxins have been made including the development of synthetic receptor decoys mimicking the natural receptor of the B-subunit of Stx, namely Gb3 (Kitov et al. 2000). More natural toxin traps have been described such as glycosphingolipid (GSL) from bovine milk (Watarai et al. 2001), pectin or pectic oligosaccharides (Olano-Martin et al. 2003). Toxin-neutralization effect was also reported for the Lipopolysaccharide

(LPS) of non pathogenic *E. coli*, and for an unknown secreted component of *Bifidobacterium*, which were able to inhibit the interaction between Stx-2 and Gb3 receptor (Gamage et al. 2004, Kim et al. 2001). Likewise, Kim et al reported in 2006 the ability of *Lactobacillus acidophilus* to interfere with the Shiga-toxin-ligand binding. In a cytotoxicity assay (MTT test), they demonstrated the ability of cell lysates from two *L. acidophilus* strains, namely A4 and 30SC, to inhibit the cytotoxicity of Stx2 on Vero cells. The inhibitory effect of *L. acidophilus* lysate was specific for Stx-2 as it was not exerted in the presence of both Stx-1 and Stx-2 (Kim et al. 2006). Toxin neutralization ability was also strain specific. Of note, cell lysate did not modify Vero cell viability when added alone. This attenuation of virulence by *L. acidophilus* lysate was confirmed *in vivo* using killing assays of *Caenorhabditis elegans*, as illustrated by a significant decline of nematode death rate. Using toxin-binding ELISA assays with monoclonal Stx-2 antibody, the specific interactions between cell lysate components and Stx-2 was confirmed, as illustrated by the lower binding of the Stx-2 monoclonal antibody to Stx-2 following treatment with *L. acidophilus* cell lysate (Kim et al. 2006). Molecules responsible for this effect still remain to be identified. Another interesting effect is the one exerted by *L. plantarum* strain CIDCA 83114, which was isolated from Kefir, a fermented-milk beverage. Cytotoxicity of *E. coli* O157:H7 supernatants upon Vero cells was dramatically reduced by this strain. This antagonism of cytotoxicity was mimicked by *L. plantarum* cell walls and the authors showed that the cell surface of CIDCA83114 binds the subunit B of Stx thereby decreasing its cytotoxicity (Kakisue et al. 2013).

Inhibition of *Clostridium difficile* cytotoxicity by a *Lactobacillus delbrueckii* secreted factor

C. difficile associated-diarrhoea is mostly due to the release of two exotoxins, namely toxins A and B, leading to intestine epithelial cell destruction. Experiments were carried out *in vitro* using Caco-2 cells that clearly pointed out the ability of a *L. delbrueckii* strain to inhibit *C. difficile* cytotoxicity (Banerjee et al. 2009). Cytotoxicity of *C. difficile* cell free supernatants was significantly lower when *C. difficile* was co-cultivated with *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B-30892 (LDB B-30892). As noticed for *E. coli* shiga toxins, *C. difficile* toxin neutralization by *L. delbrueckii* was strain dependant as such effect was not observed with six other commercially available probiotic or conventional *Lactobacillus* strains including another *L. delbrueckii* strain as well as *L. acidophilus* and *L. casei* strains. In addition, cytotoxicity of a cell free toxin preparation of *C. difficile* was significantly counteracted by the addition of cell-free supernatants from LDB B-30892, pointing out that *L. delbrueckii*

inhibition of *C. difficile* cytotoxicity was mediated through the release of a soluble component in the medium. Of note, the released component had no bactericidal effect on *C. difficile*. Although the identification of this compound still requires further investigations, the authors suggest that *L. delbrueckii* antagonism could be related to the production of an extracellular protease which would be responsible for toxin degradation, as previously proposed for *Saccharomyces boulardii* using a rat model (Castagliuolo et al. 1996, Castagliuolo et al. 1999).

LAB as toxin traps: example of aflatoxin B1

Investigation of probiotic properties often involves evaluation of auto-aggregative and co-aggregative properties with pathogens. Another interesting property is the direct titration of major virulence factors such as toxins, reducing thus their bioavailability and promoting clearance of these toxins from host.

Among toxins, aflatoxins are considered as one of the most toxic group of mycotoxins and aflatoxinB1 as the most toxic and carcinogenic aflatoxin (Gratz et al. 2007). Aflatoxins are secondary metabolites produced by some *Aspergillus* species. These fungi are present on several food and feed products, especially cereals and grains. Ingestion of food contaminated by aflatoxins may cause mutagenicity, affect the immune system and even evolve to liver cancer and finally death. It is both a major public health problem and a significant cause of economic losses. Despite efforts, large scale and cost-effective methods for food detoxification are still lacking. Biological detoxification methods appear as promising strategies to eliminate aflatoxins from food or intestinal tract. This can occur through degradation of aflatoxin to less- or nontoxic products by some microorganisms (Wu et al. 2009). Alternatively, some yeasts and bacteria, including LAB were reported to work as biological adsorbents that prevent aflatoxin's transfer to the intestinal tract of humans and animals (Fazeli et al. 2009, Hernandez-Mendoza et al. 2009, Hernandez-Mendoza et al. 2011, Peltonen et al. 2001, Wu et al. 2009). Hence, using *in vitro* approach, Peltonen et al (2001) evaluated the ability of 12 *Lactobacillus*, 5 *Bifidobacterium* and 3 *Lactococcus* strains used in the food industry to bind aflatoxin B1 (AFB1)(Peltonen et al. 2001). These strains were able to bind between 5.6 and 59.7 % AFB1 from solution, with 2 *L. amylovorus* strains and one *L. rhamnosus* strain being the most efficient strains. Similar results were obtained with LAB isolated from traditional Iranian sourdough and dairy products, including *L. casei*, *L. plantarum*, and *L. fermentum* (Fazeli et al. 2009). Binding was sensitive to pH (Hernandez-Mendoza et al. 2009) and reversible as AFB1 was released by repeated aqueous washes

(Fazeli et al. 2009, Hernandez-Mendoza et al. 2009, Hernandez-Mendoza et al. 2011, Peltonen et al. 2001). AFB1 binding capacities and stability of the bacteria-toxin complex appeared to be strongly strain-dependant and related to the bacterial cell-wall structure (Hernandez-Mendoza et al. 2009). In particular, teichoic acids were suggested to be involved in AFB1 binding by *L. reuteri* and *L. casei* (Hernandez-Mendoza et al. 2009). Moreover, in a toxicity assay using Caco-2 cells, coincubation of *L. rhamnosus* GG with AFB1 reduced its transport into the cells, the loss of transepithelial resistance as well as DNA fragmentation, indicating that this probiotic strain was able to protect against both membrane and DNA damage in the Caco-2 model (Gratz et al. 2007). The ability of some *Lactobacillus* strains to titrate AFB1 was also reported *in vivo*. Hernandez-Mendoza et al (2011) investigated the ability of *L. reuteri* NRRL1417, a strain which had been previously proved to efficiently bind AFB1 *in vitro* (Hernandez-Mendoza et al. 2009), to bind AFB1 in the intestinal tract and evaluated its effect on intestinal absorption of the toxin, dispensed in either single or multiple doses, in a murine model. *L. reuteri* was able to bind AFB1 in the intestinal tract, mostly in the duodenum. AFB1 titration by *L. reuteri* was efficient in both single and multiple dose challenges, thus reducing the bioavailability of AFB1 and avoiding its toxic effects (Hernandez-Mendoza et al. 2011). Similar results were obtained with *L. rhamnosus* strain GG, which was able to bind AFB1 and thus to modulate intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity (Gratz et al. 2006). All these results support the suggestion that some probiotic bacteria could be an interesting alternative to prevent absorption of aflatoxin in the gastrointestinal tract.

New trends: designer probiotics as toxin and pathogen traps

Looking at the different mechanisms used by probiotic LAB that counteract virulence reveals interference with the binding of the pathogen itself or its toxin(s) to their receptor(s) through titration/coaggregation or competition. Limiting the pathogen adhesion or invasion prevents establishment of an infection while toxin titration prevent cytotoxic effects until clearance of the pathogen by the host immune system. This trend has led to the development of engineered strains expressing host receptor mimics, named designer probiotics (Paton et al. 2006, Paton et al. 2010). Up to now, this strategy mainly involves engineered harmless *E. coli* strains displaying molecular mimics of host receptor glycans on their surface through expression of cloned heterologous glycosyltransferase genes. The prototype receptor mimic probiotic was designed for Shiga-toxins and EHEC while future targets include *C. difficile*. Expressing receptor mimics for toxins in probiotic LAB could allow combination with other

natural probiotic properties of these LAB. However, such therapeutics combining natural probiotic approach with GMO has to face market place resistance and tends to remain confidential unless continued propagation of antibioresistance opens avenues for the development of new concepts.

Concluding remarks.

Probiotic LAB ingested by the host confer an overall improvement in health status and/or some degree of disease prevention. They are also sometimes considered an alternative to antibiotics. Our comprehension of how their beneficial effects work is still limited. Interactions with the host's mucosae, modulation of the host immune response, barrier effect, production of antimicrobial compounds are some of the most investigated hypotheses.

The positive effects of probiotics might also be placed within a tripartite interaction (host cell-pathogen-probiotic) where probiotics might modulate the pathogen's ability to adhere to and invade host cells or might modulate virulence expression without necessarily killing the pathogenic bacteria. Most pathogens (especially opportunistic pathogens) can be found in healthy subjects in the natural ecosystem of the host. In such cases, pathogens might adopt a commensal or mutualistic lifestyle rather than live and express functions that are pathological to the host. A better comprehension of these interactions might help understanding what makes the pathogens cross the fuzzy line between commensal and pathogenic lifestyle. Such strategy, where microbial problems are actually solved with microbial solutions, still requires deep investigations and is challenging. However, it may lead to new and alternative methods to treat and prevent infectious diseases. Another challenge will arise anyway if we let the current antibiotherapies definitely turn ineffective.

Table 1. Examples of competition for a niche by probiotic LAB

LAB name	Test / Target	Pathogen	Context	Reference
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TMC 0356, <i>Lactobacillus casei</i> TMC 0409 and <i>L. rhamnosus</i> TMC 0503 (LA-2)	Adhesion inhibition <i>Caco-2</i> adhesion Human intestinal mucus	<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689, <i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29544, <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 29631, <i>Escherichia coli</i> NCTC 8603 and <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	inhibition of the adhesion and displacement of enteropathogens by lactobacilli	(Gueimonde et al. 2006)
LAB isolated from fermented pearl millet slurries (Burkina Faso) <i>L. plantarum</i> A6 (LMG 18053), <i>L. fermentum</i> Ogi E1 (CNCM I-2028), <i>L. fermentum</i> MW2 (CNCM I-2029), <i>L. manihotivorans</i> OND32, <i>L. sakei</i> 23K, <i>L. johnsonii</i> NCC 533, <i>L. acidophilus</i> NCFM	Adhesion tests HT29 and HT29-MTX cells Mucin assay (degradation)	-	LAB from tropical amylaceous fermented food have high binding capacity to intestinal epithelial cells and mucus	(Turpin et al. 2012)
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> CICC 23174 <i>L. plantarum</i> CGMCC 1.557 <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Adhesion Inhibition <i>Caco-2</i> cells	<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibition of adhesion of <i>S. aureus</i> to <i>Caco-2</i> cells by lactobacilli depends on Lactobacilli surface properties	(Ren et al. 2012)
<i>L. acidophilus</i> LAP5	Growth Inhibition (plate assay of LAB supernatant against <i>S. cholerae</i>) Invasion assay on <i>Caco-2</i>	<i>Salmonella cholerae</i> (2a and 26a strains)	invasion inhibition of <i>S. cholerae</i> to human <i>Caco-2</i> cell line	(Lin et al. 2008)

	cells			
<i>L. plantarum</i> AS1	Adhesion tests Displacement assay. HT-29 cell line	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 451	Adhesion of <i>L. plantarum</i> AS1 to HT-29 Inhibition of <i>V. parahaemolyticus</i> attachment.	(Satish et al. 2011)
<i>L. acidophilus</i> Bar13, <i>L. plantarum</i> Bar10, <i>B. longum</i> Bar33 and <i>B. lactis</i> Bar30	Adhesion and displacement test on Caco-2 cells	<i>Salmonella typhimurium</i> and <i>Escherichia coli</i> H10407	Adhesion of LAB to Caco-2 cells and inhibition of enteropathogens adhesion. Stimulation of anti-inflammatory IL-8 by HT29 cells.	(Candela et al. 2008)
<i>L. plantarum</i> CGMCC 1258	Adhesion test on Caco-2 cells	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (O111:NM, ATCC 43887)	Protection of Caco-2 cells by <i>L. plantarum</i> and purified S-layer proteins of <i>L. plantarum</i> .	(Liu et al. 2011)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Exclusion, competition, or displacement test on Caco-2 cells	Nine <i>Campylobacter jejuni</i> isolates	Reduction of adhesion/invasion of <i>C. jejuni</i> to intestinal cells	(Campana et al. 2012)
<i>L. rhamnosus</i> Kx151 A1 <i>L. reuteri</i> FJ1 <i>L. gasseri</i> MV1-21g <i>L. crispatus</i> MV24-1a	Adherence assay onto human epithelial cervical cells. ME-180 (ATCC HBT-33)	<i>Nesseiria gonorrhoeae</i> MS11mk	Competition for adhesion to human cervix cells .	(Vielfort et al. 2008)
<i>L. plantarum</i> BMCM12	Adhesion assay onto Type II mucin	<i>Escherichia coli</i> LMG2092 and <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enteric</i> LMG15860.	Inhibition of adhesion to mucin by <i>L. plantarum</i> and purified extracellular proteins of <i>L. plantarum</i>	(Sanchez and Urdaci 2012)

Table 2. Modulation of virulence by probiotic LAB: repression of virulence gene expression, toxin degradation and titration

LAB name	Pathogen/Toxin	Test	Mechanism	Reference
<i>L. reuteri</i>	<i>S. aureus</i> / SSL11,agr system, Tsst-1	<i>In vitro</i> , co-culture using an apparatus that physically separates the two species, or incubation of <i>S. aureus</i> with <i>L. reuteri</i> supernatant	Inhibition of expression of <i>ssl11</i> , the <i>agr</i> system and <i>tst</i> by secreted cyclic dipeptides	(Laughton et al. 2006, Li et al. 2011)
<i>L. lactis</i>	<i>S. aureus</i> / agr system, enterotoxins	<i>In vitro</i> , co-culture	Inhibition of expression of several virulence factors including the <i>agr</i> system and some enterotoxins; partial role of lactic acid	(Cretenet et al. 2011, Even et al. 2009)
<i>S. thermophilus</i>	<i>C. difficile</i> /toxin A	<i>In vitro</i> , incubation with <i>S. thermophilus</i> supernatant <i>In vivo</i> , murine model: live <i>S. thermophilus</i>	Inhibition of <i>tcdA</i> expression (role of lactic acid) Attenuation of infection severity in mice treated with viable <i>S. thermophilus</i> and lower toxin levels in cecal contents	(Kolling et al. 2012)
<i>L. fermentum</i>	<i>C. perfringens</i> /beta-2 toxin	<i>In vitro</i> , co-culture	Inhibition of <i>cpb2</i> expression (role of acidification)	(Allaart et al. 2011)
<i>L.L. rhamnosus</i> GG, <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>P. pentosaceus</i>	<i>E. coli</i> / shiga-toxin 2	<i>In vitro</i> , co-culture	downregulation of <i>stx2A</i> expression, as a result of pH decrease	(Carey et al. 2008)
<i>L. acidophilus</i> La5	<i>E. coli</i> / shiga-toxin 2	<i>In vitro</i> , incubation with <i>L. acidophilus</i> supernatant <i>In vivo</i> , murine model : mice	Modulation of the expression of several virulence genes including <i>stxB2</i> , <i>qseA</i> , <i>luxS</i> , <i>tir</i> , <i>ler</i> , <i>eaeA</i> , and <i>hlyB</i> by a secreted component <i>L. acidophilus</i> supernatant was found to exert	(Zeinhom et al. 2012)

		were fed for 4 days with yogurt supplemented with <i>L. acidophilus</i> La5 supernatant prior to challenge test <i>E. coli</i> O157:H7	a protective effect against enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> in mice :attenuation of clinical signs and EHEC colonization rate	
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i> / shiga-toxin 2	<i>In vitro</i> , Vero cells, co-incubation of Stx2 with cell lysates <i>In vivo</i> : killing assays of <i>Caenorhabditis elegans</i>)	Toxin neutralization:Inhibition of the cytotoxicity of Stx2 with regard to Vero Cells by cell lysates through interference with the binding of Stx2 with its cellular ligand Gb3. Significant decline of nematode death rate.	(Kim et al. 2006)
<i>L. delbrueckii</i>	<i>C. difficile</i> / toxin A and B	<i>In vitro</i> , Caco-2 cells: cytotoxicity test with a cell free toxin reparation of <i>C. difficile</i> , coincubation with <i>L. delbrueckii</i> supernatants	Toxin degradation: inhibition of <i>C. difficile</i> cytotoxicity mediated through the release of a soluble component in the medium, maybe a protease	(Banerjee et al. 2009)
<i>Lactococcus lactis</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. amylovorus</i> , <i>L. rhamnosus</i> <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , and <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. johnsonii</i>	<i>Aspergillus</i> sp./ Aflatoxin B1	<i>In vitro</i> , coincubation of AFB1 with LAB	Toxin titration: Reversible binding of Aflatoxin B1 in solution Role of teichoic acids	(Fazeli et al. 2009, Hernandez-Mendoza et al. 2009, Hernandez-Mendoza et al. 2011, Peltonen et al. 2001)
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>Aspergillus</i> sp./	<i>In vitro</i> (Caco-2 cells):	protection against both membrane and DNA	(Gratz et al. 2007)

	Aflatoxin B1	coincubation of AFB1 solution with <i>L. rhamnosus</i>	damage by incubation of AFB1 with <i>L. rhamnosus</i> in the Caco-2 model	
<i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> GG	Aspergillus sp./ Aflatoxin B1	<i>In vivo</i> (murine model): AFB1 challenge following implantation of <i>L. reuteri</i>	Toxin titration :binding of AFB1 in the intestinal tract and reduced intestinal absorption and cytotoxicity of AFB1	(Gratz et al. 2006, Hernandez-Mendoza et al. 2011)

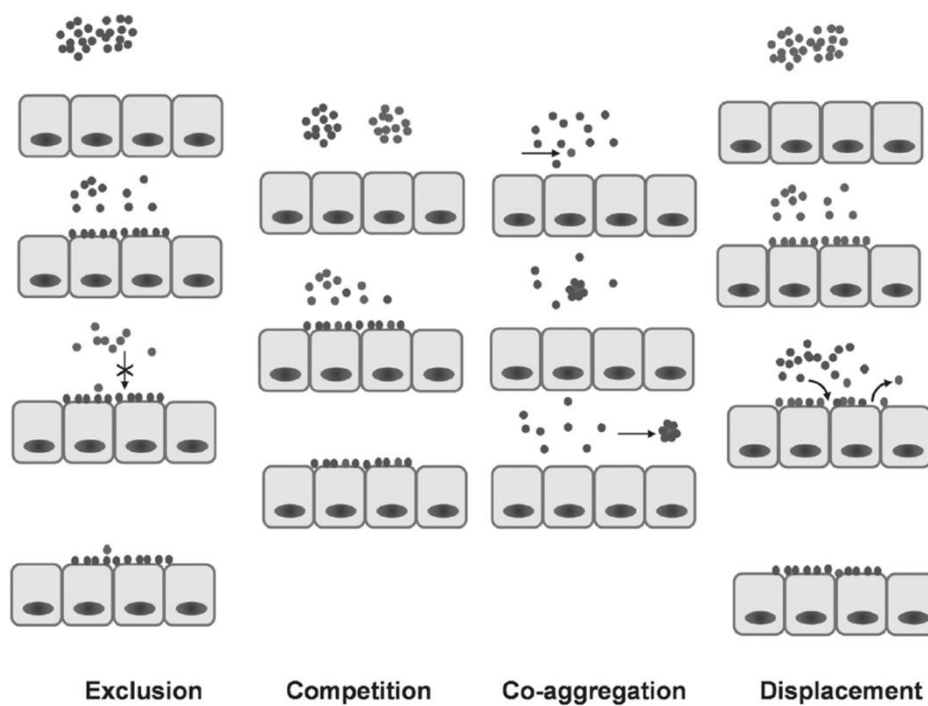
Figure legends

Figure 1. Different types of competition for a niche. Probiotic LAB (in blue) compete with pathogenic bacteria (in red) for adhesion sites on host cells (exclusion, competition, displacement) or entrap pathogenic bacteria before they can interact with host cells (co-aggregation).

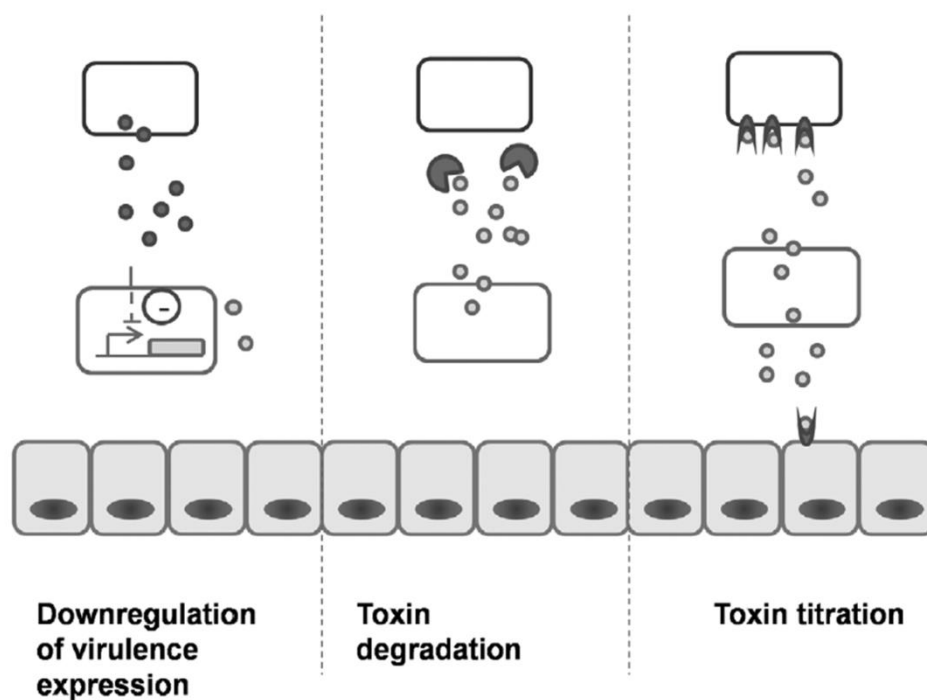


Figure 2. Inhibition of virulence by LAB. Probiotic LAB (in blue) interfere with pathogenic bacteria (in red) virulence through the inhibition of toxin gene expression, or through toxin degradation or toxin titration.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aarestrup, F. M., H. D. Larsen, N. H. Eriksen, C. S. Elsberg, and N. E. Jensen.** 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS* 107(4):425-430.
- Abe, F., N. Ishibashi, and S. Shimamura.** 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 78(12):2838-2846.
- Abel, J., O. Goldmann, C. Ziegler, C. Holtje, M. S. Smeltzer, A. L. Cheung, D. Bruhn, M. Rohde, and E. Medina.** 2011. *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J. Innate. Immun.* 3(5):495-507.
- Adams, C. A.** 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* 23(1):37-46.
- Agerer, F., A. Michel, K. Ohlsen, and C. R. Hauck.** 2003. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 278(43):42524-42531.
- Agerer, F., S. Lux, A. Michel, M. Rohde, K. Ohlsen, and C. R. Hauck.** 2005. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J. Cell Sci.* 118(10):2189-2200.
- Aguilar, B., B. Amorena, and M. Iturralde.** 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 78(2):183-191.
- Ahmed, S., S. Meghji, R. J. Williams, B. Henderson, J. H. Brock, and S. P. Nair.** 2001. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69(5):2872-2877.
- Akers, R. M.** 2000. Selection for milk production from a lactation biology viewpoint. *J. Dairy Sci.* 83(5):1151-1158.
- Akers, R. M., and S. C. Nickerson.** 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 16(4):275-289.
- Al-Asmakh, M., F. Anuar, F. Zadjali, J. Rafter, and S. Pettersson.** 2012. Gut microbial communities modulating brain development and function. *Gut Microbes.* 3(4):366-373.

- Al-Bataineh, M. M., M. D. van der, B. D. Schultz, and R. Gehring.** 2010. Tumor necrosis factor alpha increases P-glycoprotein expression in a BME-UV *in vitro* model of mammary epithelial cells. *Biopharm. Drug Dispos.* 31(8-9):506-515.
- Alekseeva, L., L. Rault, S. Almeida, P. Legembre, V. Edmond, V. Azevedo, A. Miyoshi, S. Even, F. Taieb, Y. rlot-Bonnemains, Le Loir Y. and N. Berkova.** 2013. *Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency. *PLoS. One.* 8(5):e63279.
- Alemka, A., M. Clyne, F. Shanahan, T. Tompkins, N. Corcionivoschi, and B. Bourke.** 2010. Probiotic colonization of the adherent mucus layer of HT29MTXE12 cells attenuates *Campylobacter jejuni* virulence properties. *Infect. Immun.* 78(6):2812-2822.
- Alexander, E. H., and M. C. Hudson.** 2001. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(3-4):361-366.
- Alkafafy, M., R. Rashed, and A. Helal.** 2011. Immunohistochemical studies on the bovine lactating mammary gland (*Bos taurus*). *Acta Histochem.* doi:10.1016/j.acthis.2011.02.012
- Almeida, R. A., D. A. Luther, S. J. Kumar, L. F. Calvinho, M. S. Bronze, and S. P. Oliver.** 1996a. Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 43(7):385-392.
- Almeida, R. A., K. R. Matthews, E. Cifrian, A. J. Guidry, and S. P. Oliver.** 1996b. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 79(6):1021-1026.
- Almeida, R. A., K. R. Matthews, and S. P. Oliver.** 1997. Eukaryotic and prokaryotic cell functions required for invasion of *Staphylococcus aureus* into bovine mammary epithelial cells. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 44(3):139-145.
- Almeida, R. A., W. Fang, and S. P. Oliver.** 1999. Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. *FEMS Microbiol. Lett.* 177(2):313-317.
- Almeida, R. A., and S. P. Oliver.** 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 31(5):205-212.
- Alsteens, D., E. Dague, C. Verbelen, G. Andre, V. Dupres, and Y. F. Dufrene.** 2009. Nanoscale imaging of microbial pathogens using atomic force microscopy. *Wiley. Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 1(2):168-180.
- Alva-Murillo, N., A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. Lopez-Meza.** 2012a. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet. Microbiol.* 155(2-4):324-331.

- Alva-Murillo, N., A. D. Tellez-Perez, E. Sagrero-Cisneros, J. E. Lopez-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa.** 2012b. Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells. *Cell Immunol.* 280(1):108-112.
- Alves, P. D., J. A. McCulloch, S. Even, M. C. Le, A. Thierry, N. Grosset, V. Azevedo, C. A. Rosa, E. Vautor, and Le Loir Y.** 2009. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. *Vet. Microbiol.* 137(1-2):190-195.
- Amdekar, S., V. Singh, and D. D. Singh.** 2011. Probiotic therapy: immunomodulating approach toward urinary tract infection. *Curr. Microbiol.* 63(5):484-490.
- Anaya-Lopez, J. L., O. E. Contreras-Guzman, A. Carabez-Trejo, V. M. Baizabal-Aguirre, J. E. Lopez-Meza, J. J. Valdez-Alarcon, and A. Ochoa-Zarzosa.** 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81(3):358-361.
- Andersen, S., I. R. Dohoo, R. R. Olde, and H. Stryhn.** 2010. Diagnosing intramammary infections: evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. *J. Dairy Sci.* 93(7):2966-2975.
- Anderson, J. C.** 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Br. Vet. J.* 132(3):229-245.
- Archambaud, C., M. A. Nahori, G. Soubigou, C. Becavin, L. Laval, P. Lechat, T. Smokvina, P. Langella, M. Lecuit, and P. Cossart.** 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(41):16684-16689.
- Archer, G. L.** 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 26(5):1179-1181.
- Arora, T., S. Singh, and R. K. Sharma.** 2013. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition* 29(4):591-596.
- Arroyo, R., V. Martin, A. Maldonado, E. Jimenez, L. Fernandez, and J. M. Rodriguez.** 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clin. Infect. Dis.* 50(12):1551-1558.
- Atalla, H., C. Gyles, and B. Mallard.** 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143(2-4):319-328.
- Atalla, H., C. Gyles, and B. Mallard.** 2011. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim. Health Res. Rev.* 12(1):33-45.
- Auldist, M. J.** 1996. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. *J. Dairy Res.* 63:377-386.

- Auldist, M. J., S. Coats, G. L. Rogers, and G. H. McDowell.** 1995. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Aust. J. Exp. Agric.* 35:427-436.
- Aureli, P., L. Capurso, A. M. Castellazzi, M. Clerici, M. Giovannini, L. Morelli, A. Poli, F. Pregliasco, F. Salvini, and G. V. Zuccotti.** 2011. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacol. Res.* 63(5):366-376.
- Aziz, R. K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E. M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G. J. Olsen, R. Olson, A. L. Osterman, R. A. Overbeek, L. K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G. D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke, and O. Zagnitko.** 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC. Genomics* 9:75.

B

- Baba, T., T. Bae, O. Schneewind, F. Takeuchi, and K. Hiramatsu.** 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *J. Bacteriol.* 190(1):300-310.
- Bai, S. P., A. M. Wu, X. M. Ding, Y. Lei, J. Bai, K. Y. Zhang, and J. S. Chio.** 2013. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult. Sci.* 92(3):663-670.
- Banerjee P, Merkel GJ, Bhunia AK.** 2009. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B-30892 can inhibit cytotoxic effects and adhesion of pathogenic *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *Gut Pathog.* 1(1):8.
- Bannerman, D. D., M. J. Paape, J. W. Lee, X. Zhao, J. C. Hope, and P. Rainard.** 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 11(3):463-472.
- Barboza-Corona, J. E., I. F.-S. de, N. va-Murillo, A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. Lopez-Meza.** 2009. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 138(1-2):179-183.
- Barinov, A., V. Loux, A. Hammani, P. Nicolas, P. Langella, D. Ehrlich, E. Maguin, and G. M. van de.** 2009. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics.* 9:61-73.
- Barkema, H. W., Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks.** 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89(6):1877-1895.

- Barkema, H. W., M. J. Green, A. J. Bradley, and R. N. Zadoks.** 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy Sci.* 92(10):4717-4729.
- Barlow, J.** 2011. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 16(4):383-407.
- Baron, F., M. F. Cochet, W. Ablain, N. Grosset, M. N. Madec, F. Gonnet, S. Jan, and M. Gautier.** 2006. Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Dairy Sci. Technol.* 3:251- 460
- Barrio B, Vangroenweghe F, Dosogne H, Burvenich C.** 2000. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Vet Res.* 31(6):603-9.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock.** 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89(4):1235-1243.
- Bayles KW, Iandolo JJ.** 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol.* 171(9):4799-806.
- Bayles, K. W., C. A. Wesson, L. E. Liou, L. K. Fox, G. A. Bohach, and W. R. Trumble.** 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66(1):336-342.
- Beecher, C., M. Daly, D. P. Berry, K. Klostermann, J. Flynn, W. Meaney, C. Hill, T. V. McCarthy, R. P. Ross, and L. Giblin.** 2009. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1beta and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* 76(3):340-348.
- Behnsen, J., E. Deriu, M. Sassone-Corsi, and M. Raffatellu.** 2013. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3(3):a010074.
- Ben Zakour, N. L., D. E. Sturdevant, S. Even, C. M. Guinane, C. Barbey, P. D. Alves, M. F. Cochet, M. Gautier, M. Otto, J. R. Fitzgerald, and Le Loir Y.** 2008. Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. *J. Bacteriol.* 190(19):6302-6317.
- Bercik, P., S. M. Collins, and E. F. Verdu.** 2012. Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol. Motil.* 24(5):405-413.
- Bermudez-Brito, M., J. Plaza-Diaz, S. Munoz-Quezada, C. Gomez-Llorente, and A. Gil.** 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab* 61(2):160-174.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. Henri-Dubernet, and M. Gueguen.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126(3):278-285.

- Biancone, L., I. Monteleone, B. G. Del Vecchio, P. Vavassori, and F. Pallone.** 2002. Resident bacterial flora and immune system. *Dig. Liver Dis.* 34(S2):S37-S43.
- Biswas, R., L. Voggu, U. K. Simon, P. Hentschel, G. Thumm, and F. Gotz.** 2006. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol. Lett.* 259(2):260-268.
- Bonnefont, C. M., M. Toufeer, C. Caubet, E. Foulon, C. Tasca, M. R. Aurel, D. Bergonier, S. Boullier, C. Robert-Granie, G. Foucras, and R. Rupp.** 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC. Genomics* 12:208.
- Bonnefont, C. M., P. Rainard, P. Cunha, F. Gilbert, M. Toufeer, M. R. Aurel, R. Rupp, and G. Foucras.** 2012. Genetic susceptibility to *S. aureus* mastitis in sheep: differential expression of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. *Physiol Genomics.* 44(7):403-16.
- Borchers, A. T., C. Selmi, F. J. Meyers, C. L. Keen, and M. E. Gershwin.** 2009. Probiotics and immunity. *J. Gastroenterol.* 44(1):26-46.
- Boris S, Suarez JE, Vazquez F, Barbes C.** 1998. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* 66:1985-1989.
- Bouchard, D., V. Peton, S. Almeida, M. C. Le, A. Miyoshi, V. Azevedo, N. Berkova, L. Rault, P. Francois, J. Schrenzel, S. Even, D. Hernandez, and Le Loir Y.** 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. *J. Bacteriol.* 194(22):6292-6293.
- Bouchard, D. S., L. Rault, N. Berkova, Le Loir Y. and S. Even.** 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Invasion into Bovine Mammary Epithelial Cells by Contact with Live *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(3):877-885.
- Boudjellab, N., H. S. Chan-Tang, X. Li, and X. Zhao.** 1998. Interleukin 8 response by bovine mammary epithelial cells to lipopolysaccharide stimulation. *Am. J. Vet. Res.* 59(12):1563-1567.
- Boudjellab, N., H. S. Chan-Tang, and X. Zhao.** 2000. Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8. *Comp. Physiol. Biochem.* 127(2):191-199.
- Bougarn, S., P. Cunha, A. Harmache, A. Fromageau, F. B. Gilbert, and P. Rainard.** 2010. Muramyl Dipeptide Synergizes with *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid To Recruit Neutrophils in the Mammary Gland and To Stimulate Mammary Epithelial Cells. *Clin. Vacc. Immunol.* 17(11):1797-1809.
- Bougarn, S., P. Cunha, F. B. Gilbert, A. Harmache, G. Foucras, and P. Rainard.** 2011a. Staphylococcal-associated molecular patterns enhance expression of immune defense genes induced by IL-17 in mammary epithelial cells. *Cytokine* 56(3):749-759.

- Bougarn, S., P. Cunha, F. B. Gilbert, F. Meurens, and P. Rainard.** 2011b. Technical note: Validation of candidate reference genes for normalization of quantitative PCR in bovine mammary epithelial cells responding to inflammatory stimuli. *J. Dairy Sci.* 94(5):2425-2430.
- Boulanger, D., E. Brouillette, F. Jaspar, F. Malouin, J. Mainil, F. Bureau, and P. Lekeux.** 2007. Helenalin reduces *Staphylococcus aureus* infection *in vitro* and *in vivo*. *Vet. Microbiol.* 119(2-4):330-338.
- Boutet, P., J. Sulon, R. Closset, J. Detilleux, J. F. Beckers, F. Bureau, and P. Lekeux.** 2007. Prolactin-induced activation of nuclear factor *kappaB* in bovine mammary epithelial cells: role in chronic mastitis. *J. Dairy Sci.* 90(1):155-164.
- Boutinaud, M., and H. Jammes.** 2002. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 42(2):133-147.
- Boutinaud, M., H. Rulquin, D. H. Keisler, J. Djiane, and H. Jammes.** 2002. Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *J. Anim Sci.* 80(5):1258-1269.
- Boutinaud, M., J. Guinard-Flamenta, and H. Jammes.** 2004. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod. Nutr. Dev.* 44(5):499-508.
- Boutinaud, M., L. Galio, V. Lollivier, L. Finot, S. Wiart, D. Esquerre, and E. Devinoy.** 2013. Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiol Genomics.* 45(20):973-985.
- Bradley, A.** 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164(2):116-128.
- Braem, G., V. S. De, B. Verbist, M. Heyndrickx, F. Leroy, and L. De Vuyst.** 2011. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet. Microbiol.* 157(3-4):383-390.
- Bramley, A. J., and F. H. Dodd.** 1984. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control[mdash]progress and prospects. *J. Dairy Res.* 51:481-512.
- Bramley, A. J., and R. Foster.** 1990. Effects of lysostaphin on *Staphylococcus aureus* infections of the mouse mammary gland. *Res. Vet. Sci.* 49:120-121.
- Branca, F., and L. Rossi.** 2002. The role of fermented milk in complementary feeding of young children: lessons from transition countries. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56(S4):S16-S20.
- Brandtzaeg, P.** 2010. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J. Pediatr.* 156(S2):S8-15.
- Breen, J. E., A. J. Bradley, and M. J. Green.** 2009. Quarter and cow risk factors associated with a somatic cell count greater than 199,000 cells per milliliter in United Kingdom dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92(7):3106-3115.

- Brouillette, E., G. Grondin, L. Shkreta, P. Lacasse, and B. G. Talbot.** 2003. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathog.* 35(4):159-168.
- Brouillette, E., A. Martinez, B. J. Boyll, N. E. Allen, and F. Malouin.** 2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure *in vivo*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41(1):35-41.
- Brouillette, E., and F. Malouin.** 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes. Infect.* 7(3):560-568.
- Bujnakova, D., and V. Kmet.** 2012a. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol. (Praha)* 57(4):263-267.
- Bujnakova, D., and V. Kmet.** 2012b. Inhibitory potential of lactobacilli against *Escherichia coli* internalization by HT 29 cells. *Folia Microbiol. (Praha)* 57(4):269-272.
- Bulger, R. J., and R. E. Bulger.** 1967. Ultrastructure of small colony variants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 94(4):1244-1246.
- Bushnell RB.** 1984. The importance of hygienic procedures in controlling mastitis. *Vet Clin North Am Large Anim Pract.* 6(2):361-70.

C

- Cadieux, P. A., J. Burton, E. Devillard, and G. Reid.** 2009. *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Physiol Pharmacol.* 60(S6):13-18.
- Callaway, T. R., T. S. Edrington, R. C. Anderson, R. B. Harvey, K. J. Genovese, C. N. Kennedy, D. W. Venn, and D. J. Nisbet.** 2008. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim Health Res. Rev.* 9(2):217-225.
- Calvinho, L. F., and S. P. Oliver.** 1998. Characterization of mechanisms involved in uptake of *Streptococcus dysgalactiae* by bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 63(2-4):261-274.
- Calvinho, L. F., R. A. Almeida, and S. P. Oliver.** 2001. Influence of bacterial factors on proliferation of bovine mammary epithelial cells. *Rev. Argent Microbiol.* 33(1):28-35.
- Campana, R., S. Federici, E. Ciandrini, and W. Baffone.** 2012. Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the Growth and Adhesion/Invasion Characteristics of Human *Campylobacter jejuni*. *Curr. Microbiol.* 64(4):371-378.
- Cao, L. T., J. Q. Wu, F. Xie, S. H. Hu, and Y. Mo.** 2007. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90(8):3980-3985.

- Capurro, A., A. Aspan, K. Artursson, and K. P. Waller.** 2010a. Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. *Vet. J.* 185(2):188-192.
- Capurro, A., A. Aspan, U. H. Ericsson, W. K. Persson, and K. Artursson.** 2010b. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *J. Dairy Sci.* 93(1):180-191.
- Carey, C. M., J. L. Kirk, S. Ojha, and M. Kostrzynska.** 2007. Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Can. J. Microbiol.* 53(5):537-550.
- Carlson GP, Kaneko JJ.** 1973. Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* 142(3):853-6.
- Casey, P. G., G. E. Gardiner, G. Casey, B. Bradshaw, P. G. Lawlor, P. B. Lynch, F. C. Leonard, C. Stanton, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and C. Hill.** 2007. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(6):1858-1863.
- Castaldo, C., V. Vastano, R. A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, R. Marasco, and M. Sacco.** 2009. Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb. Cell Fact.* 8:14.
- Castillo, N. A., G. Perdigon, and L. A. de Moreno de.** 2011. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC. Microbiol.* 11:177.
- Česlovas, J., J. Vigilius, and Š. Almantas.** 2005. The effect of probiotics and phytobiotics on meat properties and quality in pigs. *Vet. Zootech.* 29:80–84.
- Cetin N., B.K. Guclu and E. Cetin.** 2005. The effects of probiotic and mannaoligosaccharide on some haematological and immunological parameters in turkeys. *J. Vet. Med. A.,* 52:263-263.
- Chakraborty, S. P., M. S. Kar, S. K. Sahu, S. Das, S. Tripathy, S. Dash, P. Pramanik, and S. Roy.** 2011. Internalization of *Staphylococcus aureus* in lymphocytes induces oxidative stress and DNA fragmentation: possible ameliorative role of nanoconjugated vancomycin. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2011:942123.
- Chan, R. C., G. Reid, R. T. Irvin, A. W. Bruce, and J. W. Costerton.** 1985. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect. Immun.* 47(1):84-89.
- Chandler, R. L.** 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 3:273-282.

- Charlier, C., M. Cretenet, S. Even, and Le Loir Y.** 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1):30-39.
- Chaucheyras-Durand, F., and H. Durand.** 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes.* 1(1):3-9.
- Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner.** 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* 8(7):687-693.
- Chavakis, T., K. Wiechmann, K. T. Preissner, and M. Herrmann.** 2005. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* 94(2):278-285.
- Chen, X., O. K. Dego, R. A. Almeida, T. E. Fuller, D. A. Luther, and S. P. Oliver.** 2010. Deletion of sua gene reduces the ability of *Streptococcus uberis* to adhere to and internalize into bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 147(3-4):426-434.
- Chen, C. Y., H. Y. Tsen, C. L. Lin, B. Yu, and C. S. Chen.** 2012. Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the *Salmonella* invasion and inflammation of broiler chicks. *Poult. Sci.* 91(9):2139-2147.
- Cheung, A. L., and K. W. Bayles.** 2007. Tissue culture assays used to analyze invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 9:Unit9C.4.
- Chiang, S. S., and T. M. Pan.** 2012. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93(3):903-916.
- Chiapello, H., I. Bourgait, F. Sourivong, G. Heuclin, A. Gendrault-Jacquemard, M. A. Petit, and K. M. El.** 2005. Systematic determination of the mosaic structure of bacterial genomes: species backbone versus strain-specific loops. *BMC. Bioinformatics.* 6:171.
- Chifiriuc, M. C., C. Bleotu, L. M. Ditu, D. Smarandache, E. Sasarman, O. Banu, O. Dracea, C. Larion, and L. Veronica.** 2009. *In vivo* experimental model for the study of the influence of subinhibitory concentrations of phenyllactic acid on *Staphylococcus aureus* pathogenicity. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 68(1):34-37.
- Choi, S. S., Y. Kim, K. S. Han, S. You, S. Oh, and S. H. Kim.** 2006. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42(5):452-458.
- Choi, H. J., M. S. Shin, S. M. Lee, and W. K. Lee.** 2012. Immunomodulatory properties of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck intestinal tract and suppression of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol. Immunol.* 56(9):613-620.

- Chow, J.** 2002. Probiotics and prebiotics: A brief overview. *J. Ren Nutr.* 12(2):76-86.
- Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ.** 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol.* 168(1):171-8.
- Chrzastowska, M., M. Kander, and A. Depta.** 2009. Prospects for the use of probiotic bacteria in the treatment of gastrointestinal diseases in dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 12(2):279-284.
- Cifrian, E., A. J. Guidry, C. N. O'Brien, J. E. Keys, Jr., and W. W. Marquardt.** 1994a. Bovine mammary teat and ductal epithelial cell cultures. *Am. J. Vet. Res.* 55(2):239-246.
- Cifrian, E., A. J. Guidry, C. N. O'Brien, S. C. Nickerson, and W. W. Marquardt.** 1994b. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 77(4):970-983.
- Cifrian, E., A. J. Guidry, C. N. O'Brien, and W. W. Marquardt.** 1995. Effect of alpha-toxin and capsular exopolysaccharide on the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured teat, ductal and secretory mammary epithelial cells. *Res. Vet. Sci.* 58(1):20-25.
- Clancy, R.** 2003. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38(1):9-12.
- Clarke, G., J. F. Cryan, T. G. Dinan, and E. M. Quigley.** 2012. Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome--focus on lactic acid bacteria. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35(4):403-413.
- Coconnier-Polter, M. H., M. Lievin-Le, V, and A. L. Servin.** 2005. A *Lactobacillus acidophilus* strain of human gastrointestinal microbiota origin elicits killing of enterovirulent *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by triggering lethal bacterial membrane damage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10):6115-6120.
- Cohen, M. L.** 1986. *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 108(52):796-799.
- Collado, M. C., L. Grzeskowiak, and S. Salminen.** 2007a. Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr. Microbiol.* 55(3):260-265.
- Collado, M. C., I. Surono, J. Meriluoto, and S. Salminen.** 2007b. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *J. Food Sci.* 72(3):M89-M93.
- Collado, M. C., E. Isolauri, S. Salminen, and Y. Sanz.** 2009. The impact of probiotic on gut health. *Curr. Drug Metab* 10(1):68-78.

- Collen, D., Van, H.B., Schlott, B., Hartmann, M., Guhrs, K.H., Lijnen, H.R.,** 1993. Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic systems with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *Eur. J. Biochem.* 216:307-314.
- Commane, D., R. Hughes, C. Shortt, and I. Rowland.** 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat. Res.* 591(1-2):276-289.
- Contreras, G. A., and J. M. Rodriguez.** 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 16(4):339-356.
- Corr, S. C., C. Hill, and C. G. Gahan.** 2009. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 56:1-15.
- Corrigan, R. M., D. Rigby, P. Handley, and T. J. Foster.** 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology* 153(8):2435-2446.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Cremonesi, P., R. Capoferri, G. Pisoni, C. M. Del, F. Strozzi, R. Rupp, H. Caillat, P. Modesto, P. Moroni, J. L. Williams, B. Castiglioni, and A. Stella.** 2012. Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BMC. Genomics* 13(1):540.
- Cretenet M, Laroute V, Ulve V, Jeanson S, Nouaille S, Even S, Piot M, Girbal L, Le Loir Y, Loubiere P, Lortal S, Coccagn-Bousquet M.** 2010. Dynamic analysis of *Lactococcus lactis* transcriptome in UF-cheeses reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:247-257.
- Cribby, S., M. Taylor, and G. Reid.** 2008. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2008:256490.
- Crispie, F., M. onso-Gomez, C. O'Loughlin, K. Klostermann, J. Flynn, S. Arkins, W. Meaney, R. R. Paul, and C. Hill.** 2008. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J. Dairy Res.* 75(3):374-384.
- Cross, M. L.** 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34(4):245-253.
- Cross, M. L., and H. S. Gill.** 2001a. Can immunoregulatory lactic acid bacteria be used as dietary supplements to limit allergies? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125(2):112-119.
- Cross, M. L., L. M. Stevenson, and H. S. Gill.** 2001b. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int. Immunopharmacol.* 1(5):891-901.

Cucarella, C., M. A. Tormo, E. Knecht, B. Amorena, I. Lasa, T. J. Foster, and J. R. Penades. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.* 70(6):3180-3186.

Cucarella, C., M. A. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trottonda, M. Monzon, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penades. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72(4):2177-2185.

D

Davis, J. S. 2005. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Intern. Med. J.* 35(S2):S79-S96.

De Angelis, M., and M. Gobbetti. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics.* 4(1):106-122.

De Buyser M.L., A. Brisaboïs, E. Espié, G. Delmas and B. Dufour. 2005. Implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire en France de 1988 à 2003. *Bull. Epidemiol.* 16.

de LeBlanc, A. M., N. A. Castillo, and G. Perdigon. 2010. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Int. J. Food Microbiol.* 138(3):223-231.

De Angelis, M., S. Siragusa, L. Caputo, A. Ragni, R. Burzigotti, and M. Gobbetti. 2007. Survival and persistence of *Lactobacillus plantarum* 4.1 and *Lactobacillus reuteri* 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. *Vet. Microbiol.* 123(1-3):133-144.

de Vrese, M., and P. R. Marteau. 2007. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J. Nutr.* 137(S2):803S-811S.

Devriese, L.A., 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 56:215-220.

De Waard, R., J. Garssen, J. G. Vos, and E. Claassen. 2002. Modulation of delayed-type hypersensitivity and acquired cellular resistance by orally administered viable indigenous lactobacilli in *Listeria monocytogenes* infected Wistar rats. *Lett. Appl. Microbiol.* 35(3):256-260.

Dekker, J., M. Collett, J. Prasad, and P. Gopal. 2007. Functionality of probiotics - potential for product development. *Forum Nutr.* 60:196-208.

Delgado, S., E. O'Sullivan, G. Fitzgerald, and B. Mayo. 2007. Subtractive screening for probiotic properties of *lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J. Food Sci.* 72(8):M310-M315.

- Delgado, S., P. Garcia, L. Fernandez, E. Jimenez, M. Rodriguez-Banos, C. R. Del, and J. M. Rodriguez.** 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62:225-235.
- DeLoid, G. M., T. H. Sulahian, A. Imrich, and L. Kobzik.** 2009. Heterogeneity in macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* strains: high-throughput scanning cytometry-based analysis. *PLoS. One.* 4(7):e6209.
- Delzenne, N. M., A. M. Neyrinck, and P. D. Cani.** 2011. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb. Cell Fact.* 10(S1):S10.
- Deng, J., Y. Li, J. Zhang, and Q. Yang.** 2013. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. *Res. Vet. Sci.* 94(1):62-68.
- Detilleux, J. C.** 2002. Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88(3-4):103-110.
- Dohoo, I. R., J. Smith, S. Andersen, D. F. Kelton, and S. Godden.** 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *J. Dairy Sci.* 94(1):250-261.
- Dopfer, D., R. A. Almeida, T. J. Lam, H. Nederbragt, S. P. Oliver, and W. Gaastra.** 2000. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet. Microbiol.* 74(4):331-343.
- Dopfer, D., H. Nederbragt, R. A. Almeida, and W. Gaastra.** 2001. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 80(3):285-296.
- Drakes M, Blanchard T, Czinn S.** 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun.* 72(6):3299-309.
- Ducos, A., Eggen A., Darre R., et Boichard D.,** 2002, Les anomalies génétiques dans l'espèce bovine. *Comptes rendus du 9ème congrès. Renc. Rech. Ruminants. Paris.*
- Dufour, S., A. Frechette, H. W. Barkema, A. Mussell, and D. T. Scholl.** 2011. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 94(2):563-579.
- Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins.** 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(S2):386S-392S.
- Dziewanowska, K., J. M. Patti, C. F. Deobald, K. W. Bayles, W. R. Trumble, and G. A. Bohach.** 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67(9):4673-4678.

Dziewanowska, K., A. R. Carson, J. M. Patti, C. F. Deobald, K. W. Bayles, and G. A. Bohach. 2000. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun.* 68(11):6321-6328.

E

Ebling, T. L., L. K. Fox, K. W. Bayles, G. A. Bohach, K. M. Byrne, W. C. Davis, W. A. Ferens, and J. K. Hillers. 2001. Bovine mammary immune response to an experimental intramammary infection with a *Staphylococcus aureus* strain containing a gene for staphylococcal enterotoxin C1. *J. Dairy Sci.* 84(9):2044-2050.

Edwards, A. M., J. R. Potts, E. Josefsson, and R. C. Massey. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS. Pathog.* 6(6):e1000964.

Edwards, A. M., and R. C. Massey. 2011a. Invasion of human cells by a bacterial pathogen. *J. Vis. Exp.* doi: 10.3791/2693.

Edwards, A. M., U. Potter, N. A. Meenan, J. R. Potts, and R. C. Massey. 2011b. *Staphylococcus aureus* keratinocyte invasion is dependent upon multiple high-affinity fibronectin-binding repeats within FnBPA. *PLoS. One.* 6(4):e18899.

Eichinger, W. B., J. B. Grammer, B. Zhao, J. Bruckner, N. Mendler, R. Lange, and R. Bauernschmitt. 2005. Transcriptional regulation of alpha5beta1 integrin, fibronectin, VCAM-1, MCSF-1/c-fms, and MCP-1 in atrioventricular valves after valvular surgery and *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Cytokine* 31(6):465-472.

Elbers AR, Miltenburg JD, De Lange D, Crauwels AP, Barkema HW, Schukken YH. 1998. Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of The Netherlands. *J Dairy Sci.* 81(2):420-426.

Ellington, J. K., S. S. Reilly, W. K. Ramp, M. S. Smeltzer, J. F. Kellam, and M. C. Hudson. 1999. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 26(6):317-323.

Erasmus, L. J., P. M. Botha, and A. Kistner. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75(11):3056-3065.

Erickson, K. L., and N. E. Hubbard. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* 130(S2):403S-409S.

Erskine, R. J. 2012. Vaccination strategies for mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 28(2):257-270.

Espeche, M. C., M. C. Otero, F. Sesma, and M. E. Nader-Macias. 2009. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria

isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Vet. Microbiol.* 135(3-4):346-357.

Espeche, M. C., M. Pellegrino, I. Frola, A. Larriestra, C. Bogni, and M. E. Nader-Macias. 2012. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe.* 18(1):103-109.

Eun, C. S., Y. S. Kim, D. S. Han, J. H. Choi, A. R. Lee, and Y. K. Park. 2011. *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *APMIS.* 119(1):49-56.

Even, S., C. Charlier, S. Nouaille, N. L. Ben Zakour, M. Cretenet, F. J. Cousin, M. Gautier, M. Coccain-Bousquet, P. Loubiere, and Le Loir. Y. 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(13):4459-4472.

Evrard, B., S. Coudeyras, A. Dosgilbert, N. Charbonnel, J. Alame, A. Tridon, and C. Forestier. 2011. Dose-Dependent Immunomodulation of Human Dendritic Cells by the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS. One.* 6(4):e18735.

Ewaschuk, J. B., and L. A. Dieleman. 2006. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 12(37):5941-5950.

Ezendam, J., and L. H. van. 2006. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutr. Rev.* 64(1):1-14.

F

Fairbrother, J. M., E. Nadeau, and C. L. Gyles. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res. Rev.* 6(1):17-39.

Falagas, M. E., P. I. Rafailidis, and G. C. Makris. 2008. Bacterial interference for the prevention and treatment of infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31(6):518-522.

Felden, B., F. Vandenesch, P. Bouloc, and P. Romby. 2011. The *Staphylococcus aureus* RNome and Its Commitment to Virulence. *PLoS. Pathog.* 7(3):e1002006.

Ferens, W. A., and G. A. Bohach. 2000. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. *J. Lab Clin. Med.* 135(3):225-230.

Ferreira CL, Grześkowiak L, Collado MC, Salminen S. 2011. *In vitro* evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. *J Food Prot.* 74(9):1482-7.

- Fessler, A., C. Scott, K. Kadlec, R. Ehricht, S. Monecke, and S. Schwarz.** 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(4):619-625.
- Fioramonti, J., V. Theodorou, and L. Bueno.** 2003. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5):711-724.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V.** 1997. Finestructure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119:261-269.
- Fitzgerald, J. R., P. J. Hartigan, W. J. Meaney, and C. J. Smyth.** 2000. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J. Appl. Microbiol.* 88(6):1028-1037.
- Fitzgerald, J. R., S. R. Monday, T. J. Foster, G. A. Bohach, P. J. Hartigan, W. J. Meaney, and C. J. Smyth.** 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* 183(1):63-70
- Fitzgerald, D. C., K. G. Meade, A. N. McEvoy, L. Lillis, E. P. Murphy, D. E. MacHugh, and A. W. Baird.** 2007. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116(1-2):59-68.
- Foligne, B., S. Nutton, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poiret, J. Dewulf, D. Brassart, A. Mercenier, and B. Pot.** 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.* 13(2):236-243.
- Fontana, L., M. Bermudez-Brito, J. Plaza-Diaz, S. Munoz-Quezada, and A. Gil.** 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* 109(S2):S35-S50.
- Fooks, L. J., and G. R. Gibson.** 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr.* 88(S1):S39-S49.
- Forsgren, A., and J. Sjoquist.** 1969. Protein A from *Staphylococcus aureus*. VII. Physicochemical and immunological characterization. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 75(3):466-480.
- Forsythe, P., and J. Bienenstock.** 2010. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol. Invest.* 39(4-5):429-448.
- Foster, T.** 1996. *Staphylococcus*. Medical Microbiology. Chapter 12. 4th edition.
- Foster, T. J., and M. Hook.** 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6(12):484-488.

- Foster, T. J.** 2009. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol.* 20(5-6):456-470.
- Foster, J. A., and K. A. Mc Vey Neufeld.** 2013. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36(5):305-312.
- Fournier, B., and A. Klier.** 2004. Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150(11):3807-3819.
- Fowler, T., E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, T. J. Foster, and M. Hook.** 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* 79(10):672-679.
- Fowler, T., S. Johansson, K. K. Wary, and M. Hook.** 2003. Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol.* 5(6):417-426.
- Fox, L. K.** 2009. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):82-88.
- Fox, L. K.** 2012. Mycoplasma mastitis: causes, transmission, and control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 28(2):225-237.
- Fragkou IA, Skoufos J, Cripps PJ, Kyriazakis I, Papaioannou N, Boscós CM, Tzora A, Fthenakis GC.** 2007. Differences in susceptibility to Mannheimia haemolytica-associated mastitis between two breeds of dairy sheep. *J Dairy Res.* 74(3):349-55.
- Frandsen R.D.** 1986. Anatomy and physiology of farm animals. 4th edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Franz, S., M. Floek, and M. Hofmann-Parisot.** 2009. Ultrasonography of the bovine udder and teat. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 25(3):669-85.
- Fraunholz, M., and B. Sinha.** 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2:43.
- Frazee, B. W., and D. D. Price.** 2006. Images in emergency medicine. Extensive deep venous thrombosis with dilated collaterals and confirmatory emergency department ultrasound. *Ann. Emerg. Med.* 47(3):292-308.
- Frazier, T. H., J. K. DiBaise, and C. J. McClain.** 2011. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 35(5S):14S-20S.
- Frola, I. D., M. S. Pellegrino, M. C. Espeche, J. A. Giraudo, M. E. Nader-Macias, and C. I. Bogni.** 2011. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *J. Dairy Res.* 79(1):84-92.

- Frola, I. D., M. S. Pellegrino, G. Magnano, J. A. Giraudo, M. C. Espeche, M. E. Nader-Macias, and C. I. Bogni.** 2013. Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *J. Dairy Res.* 80(1):28-35.
- Fromageau, A., F. B. Gilbert, G. Prevost, and P. Rainard.** 2010. Binding of the *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM to its leucocyte targets. *Microb. Pathog.* 49(6):354-362.
- Fromageau, A., P. Cunha, F. B. Gilbert, and P. Rainard.** 2011. Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F' does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 51(6):396-401.
- Frost, A. J., D. D. Wanasinghe, and J. B. Woolcock.** 1977. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect. Immun.* 15(1):245-253.
- Fu, Y., E. Zhou, Z. Liu, F. Li, D. Liang, B. Liu, X. Song, F. Zhao, X. Fen, D. Li, Y. Cao, X. Zhang, N. Zhang, and Z. Yang.** 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155(4):245-252.
- Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H, Fujii T.** 2004. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 135(3):205-15
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66(5):365-378.
- Funk DA.** 1993. Optimal genetic improvement for the high producing herd. *J Dairy Sci.* 76(10):3278-86.

G

- Gaggia, F., P. Mattarelli, and B. Biavati.** 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141(S1):S15-S28.
- Gan, B. S., J. Kim, G. Reid, P. Cadieux, and J. C. Howard.** 2002. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J. Infect. Dis.* 185(9):1369-1372.
- Gao, W., K. Chua, J. K. Davies, H. J. Newton, T. Seemann, P. F. Harrison, N. E. Holmes, H. W. Rhee, J. I. Hong, E. L. Hartland, T. P. Stinear, and B. P. Howden.** 2010. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS. Pathog.* 6(6):e1000944.
- Garn H, J.F. Neves, R.S. Blumberg, H. Renz.** 2013. Effect of barrier microbes on organ-based inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 131(6):1465-1478.

- Garrett, W. S., J. I. Gordon, and L. H. Glimcher.** 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140(6):859-870.
- Garzoni, C., P. Francois, A. Huyghe, S. Couzinet, C. Tapparel, Y. Charbonnier, A. Renzoni, S. Lucchini, D. P. Lew, P. Vaudaux, W. L. Kelley, and J. Schrenzel.** 2007. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC. Genomics* 8:171.
- Garzoni, C., and W. L. Kelley.** 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 17(2):59-65.
- Gayard V.** 2000. Physiologie de la lactation. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
- Gatesoupe, F. J.** 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14(1-3):107-114.
- Genini, S., B. Badaoui, G. Sclep, S. C. Bishop, D. Waddington, Pinard van der Laan MH, C. Klopp, C. Cabau, H. M. Seyfert, W. Petzl, K. Jensen, E. J. Glass, G. A. de, H. E. Smith, M. A. Smits, I. Olsaker, G. M. Boman, G. Pisoni, P. Moroni, B. Castiglioni, P. Cremonesi, C. M. Del, E. Foulon, G. Foucras, R. Rupp, and E. Giuffra.** 2011. Strengthening insights into host responses to mastitis infection in ruminants by combining heterogeneous microarray data sources. *BMC. Genomics* 12(1):225.
- Gentilini, E., G. Denamiel, P. Llorente, S. Godaly, M. Rebuelto, and O. DeGregorio.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 83(6):1224-1227.
- Geoghegan, J. A., R. M. Corrigan, D. T. Gruszka, P. Speziale, J. P. O'Gara, J. R. Potts, and T. J. Foster.** 2010. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192(21):5663-5673.
- German, T., and I. Barash.** 2002. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 38(5):282-292.
- Gilbert, F. B., P. Cunha, K. Jensen, E. J. Glass, G. Foucras, C. Robert-Granie, R. Rupp, and P. Rainard.** 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet. Res.* 44(1):40.
- Gill, H. S., F. Doull, K. J. Rutherford, and M. L. Cross.** 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.* 84 (S1):S111-S117.
- Gill, H. S.** 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5):755-773.
- Gill, H., and J. Prasad.** 2008. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:423-454.

- Gill JJ, Sabour PM, Gong J, Yu H, Leslie KE, Griffiths MW.** 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 56(3):471-481.
- Gioacchini, G., F. Maradonna, F. Lombardo, D. Bizzaro, I. Olivotto, and O. Carnevali.** 2010. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction.* 140(6):953-959.
- Giraffa, G., N. Chanishvili, and Y. Widyastuti.** 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.* 161(6):480-487.
- Goerke, C., R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B. M. Broker, J. Doskar, and C. Wolz.** 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J. Bacteriol.* 191(11):3462-3468.
- Goldammer, T., H. Zerbe, A. Molenaar, H. J. Schuberth, R. M. Brunner, S. R. Kata, and H. M. Seyfert.** 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 11(1):174-185.
- Goldin, B. R.** 1998. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* 80(S4):S203-S207.
- Gomez-Llorente, C., S. Munoz, and A. Gil.** 2010. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc. Nutr. Soc.* 69(3):381-389.
- González RN and D.J. Wilson.** 2003. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19(1):199-221.
- Gorini C.** 1924. La microflore mammaire en rapport avec la traite. *Le lait.* 4(1924):856-859.
- Gorini C.** 1926. Sur les coccus mammaires et les coccus analogues. *Le lait.* Tome VI; N°52
- Gorini C.** 1927. L'action et la stimulation des streptocoques dans le lait. *Le lait.* Tome VII. N°63.
- Gougoulis DA, Kyriazakis I, Tzora A, Taitzoglou IA, Skoufos J, Fthenakis GC.** 2008. Effects of lamb sucking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *Reprod Domest Anim.* 43(1):22-6.
- Greene, W. A., A. M. Gano, K. L. Smith, J. S. Hogan, and D. A. Todhunter.** 1991. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 74(9):2976-2981.
- Gressley, T. F., M. B. Hall, and L. E. Armentano.** 2011. Ruminant Nutrition Symposium: Productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants. *J. Anim Sci.* 89(4):1120-1130.

- Grigg, J. C., G. Ukpabi, C. F. Gaudin, and M. E. Murphy.** 2010. Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J. Inorg. Biochem.* 104(3):341-348.
- Grimoud, J., H. Durand, S. S. de, P. Monsan, F. Ouarne, V. Theodorou, and C. Roques.** 2010. *In vitro* screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Int. J. Food Microbiol.* 144(1):42-50.
- Grootenhuys, G.** 1981. Mastitis prevention by selection of sires. *Vet. Rec.* 108(12):258-260.
- Guarner, F., F. Casellas, N. Borrueal, M. Antolin, S. Videla, J. Vilaseca, and J. R. Malagelada.** 2002. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (S4):S34-S38.
- Guarner, F.** 2003. Microecology as a target for therapeutic intervention in inflammatory bowel disease. *IDrugs.* 6(9):868-873.
- Guarner, F.** 2006. Enteric flora in health and disease. *Digestion* 73(SI)5-12.
- Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S.** 2007. Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile--a preliminary study. *Int J Food Microbiol.* 113(2):228-32.
- Guimaraes, V. D., S. Innocentin, F. Lefevre, V. Azevedo, J. M. Wal, P. Langella, and J. M. Chatel.** 2006. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11):7091-7097.
- Guinane, C. M., N. L. Ben Zakour, M. A. Tormo-Mas, L. A. Weinert, B. V. Lowder, R. A. Cartwright, D. S. Smyth, C. J. Smyth, J. A. Lindsay, K. A. Gould, A. Witney, J. Hinds, J. P. Bollback, A. Rambaut, J. R. Penades, and J. R. Fitzgerald.** 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* 2:454-466.
- Gunther, J., K. Esch, N. Poschadel, W. Petzl, H. Zerbe, S. Mitterhuemer, H. Blum, and H. M. Seyfert.** 2010. Comparative kinetics of *E. coli* vs. *S. aureus* specific activation of key- immune pathways in Mammary Epithelial Cell: *S. aureus* elicits a delayed response dominated by IL-6, but not by IL-1A or TNF- α . *Infect. Immun.* 79(2): 695-707.
- Gustafsson, R. J., S. Ahrne, B. Jeppsson, C. Benoni, C. Olsson, M. Stjernquist, and B. Ohlsson.** 2011. The *Lactobacillus* flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC. Womens Health* 11(1):17.

H

- Haenni, M., L. Galofaro, C. Ponsin, M. Bes, F. Laurent, and J. Y. Madec.** 2010. Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human

- Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. J. Antimicrob. Chemother. 66(1):216-218.
- Haggar, A., M. Hussain, H. Lonnie, M. Herrmann, A. Norrby-Teglund, and J. I. Flock.** 2003. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. Infect. Immun. 71(5):2310-2317.
- Halasa T., K., Huijps, O. Østerås, H. Hogeveen.** 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet Q. 29(1):18-31.
- Halasa T.** 2012. Bioeconomic modeling of intervention against clinical mastitis caused by contagious pathogens. J Dairy Sci. 95(10):5740-5749.
- Hartleib, J., N. Kohler, R. B. Dickinson, G. S. Chhatwal, J. J. Sixma, O. M. Hartford, T. J. Foster, G. Peters, B. E. Kehrel, and M. Herrmann.** 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. Blood. 96(6):2149-2156.
- Haslinger-Löffler, B., B. C. Kahl, M. Grundmeier, K. Strangfeld, B. Wagner, U. Fischer, A. L. Cheung, G. Peters, K. Schulze-Osthoff, and B. Sinha.** 2005. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. Cell Microbiol. 7(8):1087-1097.
- Haslinger-Löffler, B., B. Wagner, M. Bruck, K. Strangfeld, M. Grundmeier, U. Fischer, W. Volker, G. Peters, K. Schulze-Osthoff, and B. Sinha.** 2006. *Staphylococcus aureus* induces caspase-independent cell death in human peritoneal mesothelial cells. Kidney Int. 70(6):1089-1098.
- Hauck, C. R., F. Agerer, P. Muenzner, and T. Schmitter.** 2006. Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. Eur. J. Cell Biol. 85(3-4):235-242.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslof, A., Pyorala, S.,** 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. J. Clin. Microbiol. 46:3728-3735.
- Hebert, A., K. Sayasith, S. Senechal, P. Dubreuil, and J. Lagace.** 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. FEMS Microbiol. Lett. 193(1):57-62.
- Heilbronner, S., M. T. Holden, T. A. van, J. A. Geoghegan, T. J. Foster, J. Parkhill, and S. D. Bentley.** 2011. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. FEMS Microbiol. Lett. 322(1):60-67.
- Heilmann, C.** 2011. Adhesion mechanisms of staphylococci. Adv. Exp. Med. Biol. 715:105-123.
- Heineman, J., S. Bubenik, S. McClave, and R. Martindale.** 2012. Fighting fire with fire: is it time to use probiotics to manage pathogenic bacterial diseases? Curr. Gastroenterol. Rep. 14(4):343-348.

- Hennekinne, J.A., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, M.L.,** 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.* 94:321–329.
- Henry-Stanley, M. J., B. Zhang, S. L. Erlandsen, and C. L. Wells.** 2006. Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on enterocyte shedding of syndecan-1 and associated decreases in internalization of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Cytokine* 34(5-6):252-259.
- Hensen, S. M., M. J. Pavicic, J. A. Lohuis, J. A. de Hoog, and B. Poutrel.** 2000a. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.* 83(9):1966-1975.
- Hensen, S. M., M. J. Pavicic, J. A. Lohuis, and B. Poutrel.** 2000b. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci.* 83(3):418-429.
- Heo, J. M., F. O. Opapeju, J. R. Pluske, J. C. Kim, D. J. Hampson, and C. M. Nyachoti.** 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim Physiol Anim Nutr.* 97(2):207-237.
- Hermans, D., D. K. Van, W. Messens, A. Martel, I. F. Van, F. Haesebrouck, G. Rasschaert, M. Heyndrickx, and F. Pasmans.** 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet. Microbiol.* 152(3-4):219-228.
- Hernandez, D., P. Francois, L. Farinelli, M. Osteras, and J. Schrenzel.** 2008. *De novo* bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. *Genome Res.* 18:802-809.
- Herron, L. L., R. Chakravarty, C. Dwan, J. R. Fitzgerald, J. M. Musser, E. Retzel, and V. Kapur.** 2002. Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino Acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70(7):3978-3981.
- Herron-Olson, L., J. R. Fitzgerald, J. M. Musser, and V. Kapur.** 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS. One.* 2(10):e1120.
- Herthelius, M., S. L. Gorbach, R. Mollby, C. E. Nord, L. Pettersson, and J. Winberg.** 1989. Elimination of vaginal colonization with *Escherichia coli* by administration of indigenous flora. *Infect. Immun.* 57(8):2447-2451.
- Hess, D. J., M. J. Henry-Stanley, E. A. Erickson, and C. L. Wells.** 2003. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *J. Surg. Res.* 114(1):42-49.
- Heyman, M.** 2000. Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 19(S2):137S-146S.

- Higgins, S. E., J. P. Higgins, A. D. Wolfenden, S. N. Henderson, A. Torres-Rodriguez, G. Tellez, and B. Hargis.** 2008. Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella enteritidis* in neonatal broiler chicks. *Poult. Sci.* 87(1):27-31.
- Hinrichs, D., J. Bennewitz, E. Stamer, W. Junge, E. Kalm, and G. Thaller.** 2011. Genetic analysis of mastitis data with different models. *J. Dairy Sci.* 94(1):471-478.
- Hirschhausen, N., T. Schlesier, M. A. Schmidt, F. Gotz, G. Peters, and C. Heilmann.** 2010. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol.* 12(12):1746-1764.
- Hoesl, C. E., and J. E. Altwein.** 2005. The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *Eur. Urol.* 47(3):288-296.
- Hoffmann, C., K. Ohlsen, and C. R. Hauck.** 2011. Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *Eur. J. Cell Biol.* 90(11):891-896.
- Holmes, M. A., and R. N. Zadoks.** 2011. Methicillin Resistant *S. aureus* in Human and Bovine Mastitis. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 16(4):373-382.
- Holmes, S.** 2003. Are probiotics and other functional foods the medicines of the future? *Prof. Nurse* 18(11):627-630.
- Holvoet, S., A. W. Zuercher, F. Julien-Javaux, M. Perrot, and A. Mercenier.** 2013. Characterization of candidate anti-allergic probiotic strains in a model of th2-skewed human peripheral blood mononuclear cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161(2):142-154.
- Hookman, P., and J. S. Barkin.** 2009. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J. Gastroenterol.* 15(13):1554-1580.
- Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, L. Shaw, J. K. Lithgow, and S. J. Foster.** 2002. sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* 184(19):5457-5467.
- Hovinen, M., and S. Pyorala.** 2011. Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. *J. Dairy Sci.* 94(2):547-562.
- Howarth, G. S., and H. Wang.** 2013. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients.* 5(1):58-81.
- Hsueh, H. Y., P. Y. Yueh, B. Yu, X. Zhao, and J. R. Liu.** 2010. Expression of *Lactobacillus reuteri* Pg4 Collagen-Binding Protein Gene in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *J. Agric. Food Chem.* 58(23):12182-12191.

- Hu, C., R. Gong, A. Guo, and H. Chen.** 2010. Protective effect of ligand-binding domain of fibronectin-binding protein on mastitis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. *Vaccine* 28(24):4038-4044.
- Hu, H., J. Wang, D. Bu, H. Wei, L. Zhou, F. Li, and J. J. Loo.** 2009. *In vitro* culture and characterization of a mammary epithelial cell line from Chinese Holstein dairy cow. *PLoS. One.* 4(11):e7636.
- Hu, Y., J. Ulstrup, J. Zhang, S. Molin, and V. Dupres.** 2011. Adhesive properties of *Staphylococcus epidermidis* probed by atomic force microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13(21):9995-10003.
- Hudson, M. C., W. K. Ramp, N. C. Nicholson, A. S. Williams, and M. T. Nousiainen.** 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 19(6):409-419.
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA.** 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 6(6):e21313.
- Hussain, M., D. Schafer, K. M. Juuti, G. Peters, B. Haslinger-Löffler, P. I. Kuusela, and B. Sinha.** 2009. Expression of Pls (plasmin sensitive) in *Staphylococcus aureus* negative for pls reduces adherence and cellular invasion and acts by steric hindrance. *J. Infect. Dis.* 200(1):107-117.
- Huynh, H. T., G. Robitaille, and J. D. Turner.** 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an *in vitro* model for bovine lactation. *Exp. Cell Res.* 197(2):191-199.
- Hyvonen, P., L. Suojala, T. Orro, J. Haaranen, O. Simola, C. Rontved, and S. Pyorala.** 2006. Transgenic cows that produce recombinant human lactoferrin in milk are not protected from experimental *Escherichia coli* intramammary infection. *Infect. Immun.* 74(11):6206-6212.
- Hyvonen, P., S. Kayhko, S. Taponen, W. A. von, and S. Pyorala.** 2009. Effect of bovine lactoferrin on the internalization of coagulase-negative staphylococci into bovine mammary epithelial cells under in-vitro conditions. *J. Dairy Res.* 76(2):144-151.
- Hynonen, U., B. Westerlund-Wikstrom, A. Palva, and T. K. Korhonen.** 2002. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 184(12):3360-3367.

I

- Ichikawa, S., R. Fujii, D. Fujiwara, Y. Komiyama, T. Kaisho, M. Sakaguchi, and Y. Konishi.** 2007. MyD88 but not TLR2, 4 or 9 is essential for IL-12 induction by lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(12):3026-3032.

- Imre, G., and K. Rajalingam.** 2012. Role for caspase-2 during pore-forming toxin-mediated apoptosis. *Cell Cycle* 11(20):3709-3710.
- Innocentin, S., V. Guimaraes, A. Miyoshi, V. Azevedo, P. Langella, J. M. Chatel, and F. Lefevre.** 2009. *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(14):4870-4878.
- Ishikawa, H., E. Kutsukake, T. Fukui, I. Sato, T. Shirai, T. Kurihara, N. Okada, H. Danbara, M. Toba, N. Kohda, Y. Maeda, and T. Matsumoto.** 2010. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain b240 protected mice against *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(7):1338-1342.
- Isigidi, B., Devriese, L., Godard, C., Hoof van, J.,** 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:145-147.
- Isobe, N., K. Hosoda, and Y. Yoshimura.** 2009. Immunolocalization of lingual antimicrobial peptide (LAP) in the bovine mammary gland. *Anim Sci. J.* 80(4):446-450.
- Iturralde, M., B. Aguilar, R. Baselga, and B. Amorena.** 1993. Adherence of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strains to epithelial cells from ovine mammary gland primary cultures and from a rat intestinal cell line. *Vet. Microbiol.* 38(1-2):115-127.

J

- Jami, E., A. Shabtay, M. Nikbachat, E. Yosef, J. Miron, and I. Mizrahi.** 2012a. Effects of adding a concentrated pomegranate-residue extract to the ration of lactating cows on *in vivo* digestibility and profile of rumen bacterial population. *J. Dairy Sci.* 95(10):5996-6005.
- Jami E, Mizrahi I.** 2012b. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One.* 7(3):e33306.
- Jarry, T. M., G. Memmi, and A. L. Cheung.** 2008. The expression of alpha-haemolysin is required for *Staphylococcus aureus* phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells. *Cell Microbiol.* 10(9):1801-1814.
- Jett, B. D., and M. S. Gilmore.** 2002. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect. Immun.* 70(8):4697-4700.
- Jevon, M., C. Guo, B. Ma, N. Mordan, S. P. Nair, M. Harris, B. Henderson, G. Bentley, and S. Meghji.** 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect. Immun.* 67(5):2677-2681.

- Jimenez, E., L. Fernandez, A. Maldonado, R. Martin, M. Olivares, J. Xaus, and J. M. Rodriguez.** 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(15):4650-4655.
- Joh, D., E. R. Wann, B. Kreikemeyer, P. Speziale, and M. Hook.** 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol.* 18(3):211-223.
- Johannsen, H., and S. L. Prescott.** 2009. Practical prebiotics, probiotics and synbiotics for allergists: how useful are they? *Clin. Exp. Allergy* 39(12):1801-1814.
- Johnson-Henry, K. C., K. A. Donato, G. Shen-Tu, M. Gordanpour, and P. M. Sherman.** 2008. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect. Immun.* 76(4):1340-1348.
- Jonsson, H., E. Strom, and S. Roos.** 2001. Addition of mucin to the growth medium triggers mucus-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204(1):19-22.
- Juárez Tomás, M.S., Saralegui Duhart CI, De Gregorio PR, Vera Pingitore E, Nader-Macías ME.** 2011. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 159(2):399-406.
- Juárez Tomás, M. S., V. S. Ocana, and M. E. Nader-Macias.** 2004. Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. *Anaerobe.* 10(1):1-5.
- Juárez Tomás, M. S., V. S. Ocana, B. Wiese, and M. E. Nader-Macias.** 2003. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 52(12):1117-1124.

K

- Kahl, B. C., M. Goulain, W. W. Van, M. Herrmann, S. M. Simon, G. Kaplan, G. Peters, and A. L. Cheung.** 2000. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.* 68(9):5385-5392.
- Kalliomaki, M., S. Salminen, and E. Isolauri.** 2008. Positive interactions with the microbiota: probiotics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 635:57-66.
- Kampen, A. H., T. Tollersrud, and A. Lund.** 2005. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils *in vitro*. *Infect. Immun.* 73(3):1578-1583.
- Kankainen, M., L. Paulin, S. Tynkkynen, O. von, I. J. Reunanen, P. Partanen, R. Satokari, S. Vesterlund, A. P. Hendrickx, S. Lebeer, S. C. De Keersmaecker, J.**

- Vanderleyden, T. Hamalainen, S. Laukkanen, N. Salovuori, J. Ritari, E. Alatalo, R. Korpela, T. Mattila-Sandholm, A. Lassig, K. Hatakka, K. T. Kinnunen, H. Karjalainen, M. Saxelin, K. Laakso, A. Surakka, A. Palva, T. Salusjarvi, P. Auvinen, and W. M. de Vos.** 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(40):17193-17198.
- Karska-Wysocki, B., M. Bazo, and W. Smoragiewicz.** 2010. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol. Res.* 165(8):674-686.
- Kaur, I. P., K. Chopra, and A. Saini.** 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15(1):1-9.
- Kechaou, N., F. Chain, J. J. Gratadoux, S. Blugeon, N. Bertho, C. Chevalier, G. R. Le, S. Courau, P. Molimard, J. M. Chatel, P. Langella, and L. G. Bermudez-Humaran.** 2013. Identification of one novel candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strain active against influenza virus infection in mice by a large-scale screening. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(5):1491-1499.
- Kenny, M., H. Smidt, E. Mengheri, and B. Miller.** 2011. Probiotics - do they have a role in the pig industry? *Animal.* 5(3):462-470.
- Kerr, J. R.** 1999. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *Mol. Pathol.* 52(4):220-230.
- Kerro-Dego O., J. E. van Dijk, and H. Nederbragt.** 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24(4):181-198.
- Kerro-Dego O., S. P. Oliver, and R. A. Almeida.** 2011a. Host-pathogen gene expression profiles during infection of primary bovine mammary epithelial cells with *Escherichia coli* strains associated with acute or persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 155(2-4):291-297.
- Kerro-Dego, O., T. Prysliak, J. Perez-Casal, and A. A. Potter.** 2011b. Role of GapC in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* 156(3-4):443-447.
- Khan M.Z. and A. Khan.** 2006. Basic facts of mastitis in dairy animals: a review. *Pakistan Vet. J.* 26(4):204-208.
- Khan, S. H., and F. A. Ansari.** 2007. Probiotics--the friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.* 20(1):76-82.
- Kidd, P.** 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* 8(3):223-246.
- Kim, J. Y., M. S. Park, and G. E. Ji.** 2012. Probiotic modulation of dendritic cells co-cultured with intestinal epithelial cells. *World J. Gastroenterol.* 18(12):1308-1318.

- Kim, K. W., J. Im, J. H. Jeon, H. G. Lee, C. H. Yun, and S. H. Han.** 2011. *Staphylococcus aureus* induces IL-1 β expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE and NF- κ B transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34(4):347-354.
- Kim, S. Y., S. Shin, H. C. Koo, J. H. Youn, H. D. Paik, and Y. H. Park.** 2010. In vitro antimicrobial effect and *in vivo* preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lactacin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 93(8):3610-3615.
- Kinova, S. H., A. Bilkova, and M. Bukovsky.** 2008. [Lactobacilli and their probiotic properties]. *Ceska. Slov. Farm.* 57(2):95-98.
- Kintarak, S., S. A. Whawell, P. M. Speight, S. Packer, and S. P. Nair.** 2004. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect. Immun.* 72(10):5668-5675.
- Kirpich, I. A., and C. J. McClain.** 2012. Probiotics in the treatment of the liver diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 31(1):14-23.
- Kisich, K. O., M. D. Howell, M. Boguniewicz, H. R. Heizer, N. U. Watson, and D. Y. Leung.** 2007. The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J. Invest. Dermatol.* 127(10):2368-2380.
- Klaenhammer, T. R.** 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J. Nutr.* 130(S2):415S-416S.
- Kloos, W. E., R. J. Zimmerman, and R. F. Smith.** 1976. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(1):53-59.
- Klostermann, K., F. Crispie, J. Flynn, R. P. Ross, C. Hill, and W. Meaney.** 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75(3):365-373.
- Klostermann, K., F. Crispie, J. Flynn, W. J. Meaney, R. R. Paul, and C. Hill.** 2010. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lactacin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *J. Dairy Res.* 77(2):231-238.
- Kmet, V., and F. Lucchini.** 1997. Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19(2):111-114.
- Ko, J. S.** 2013. [The intestinal microbiota and human disease]. *Korean J. Gastroenterol.* 62(2):85-91.
- Koizumi, S., D. Wakita, T. Sato, R. Mitamura, T. Izumo, H. Shibata, Y. Kiso, K. Chamoto, Y. Togashi, H. Kitamura, and T. Nishimura.** 2008. Essential role of Toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1(+) cell-dependent activation of type 1 immunity by *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84. *Immunol. Lett.* 120(1-2):14-19.

- Kolling, G. L., M. Wu, C. A. Warren, E. Durmaz, T. R. Klaenhammer, M. P. Timko, and R. L. Guerrant.** 2012. Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* alters *Clostridium difficile* infection and *in vitro* Toxin A production. *Gut Microbes*. 3(6):523-529.
- Kopp, M. V., and P. Salfeld.** 2009. Probiotics and prevention of allergic disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 12(3):298-303.
- Korecka A, Arulampalam V.** 2012. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator? *J. Oral Microbiol.* doi: 10.3402/jom.v4i0.9367.
- Kovachev, S.** 2011. [Vaginal ecosystem]. *Akush. Ginekolog.* 50(3):41-49.
- Kovalenko, N. K., S. A. Kasumova, and T. N. Golovach.** 1990. [The adhesion of lactic acid bacteria to the intestinal epithelium of agricultural animals]. *Mikrobiol. Zh.* 52(3):76-79.
- Kozytska, S., D. Stauss, M. C. Pawlik, S. Hensen, M. Eckart, W. Ziebuhr, W. Witte, and K. Ohlsen.** 2010. Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 145(3-4):360-365.
- Kritas, S. K., and R. B. Morrison.** 2007. Effect of orally administered *Lactobacillus casei* on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus vaccination in pigs. *Vet. Microbiol.* 119(2-4):248-255.
- Kromker, V., and J. Friedrich.** 2009. Teat canal closure in non-lactating heifers and its association with udder health in the consecutive lactation. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):100-105.
- Kruis, W.** 2004. Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20(S4):75-78.
- Krut, O., O. Utermohlen, X. Schlossherr, and M. Kronke.** 2003. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect. Immun.* 71(5):2716-2723.
- Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. iag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, and J. Potempa.** 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS. One.* 3(1):e1409.
- Kumar, D., J. J. Cawley, J. M. Irizarry-Alvarado, A. Alvarez, and S. Alvarez.** 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies coagulans endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. *Transpl. Infect. Dis.* 9(4):336-338.
- Kung, L., Jr., C. C. Taylor, M. P. Lynch, and J. M. Neylon.** 2003. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86(1):336-343.

- Kurtoglu, V., F. Kurtoglu, E. Seker, B. Coskun, T. Balevi, and E. S. Polat.** 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Addit. Contam.* 21(9):817-823.
- Kurtz, S., A. Phillippy, A. L. Delcher, M. Smoot, M. Shumway, C. Antonescu, and S. L. Salzberg.** 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5:R12.
- Kusch, K., K. Hanke, S. Holtfreter, M. Schmutde, C. Kohler, C. Erck, J. Wehland, M. Hecker, K. Ohlsen, B. Broker, and S. Engelmann.** 2011. The influence of SaeRS and sigma(B) on the expression of superantigens in different *Staphylococcus aureus* isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* 301(6):488-499.
- Kushnaryov, V. M., H. S. MacDonald, R. Reiser, and M. S. Bergdoll.** 1984. Staphylococcal toxic shock toxin specifically binds to cultured human epithelial cells and is rapidly internalized. *Infect. Immun.* 45(3):566-571.

L

- La Ragione, R. M., A. Narbad, M. J. Gasson, and M. J. Woodward.** 2004. *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* 38(3):197-205.
- Laarman, A. J., M. Ruyken, C. L. Malone, J. A. van Strijp, A. R. Horswill, and S. H. Rooijakkers.** 2011. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J. Immunol.* 186(11):6445-6453.
- Lahouassa, H., E. Moussay, P. Rainard, and C. Riollet.** 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 38(1):12-21.
- Lahtinen, S. J., E. Davis, and A. C. Ouwehand.** 2012. *Lactobacillus* species causing obesity in humans: where is the evidence? *Benef. Microbes.* 3(3):171-174.
- Lammers, A., P. J. Nuijten, E. Kruijt, N. Stockhofe-Zurwieden, U. Vecht, H. E. Smith, and F. G. van Zijderveld.** 1999a. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. *Vet. Microbiol.* 67(2):77-89.
- Lammers, A., P. J. Nuijten, and H. E. Smith.** 1999b. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 180(1):103-109.
- Lara-Villoslada, F., M. Olivares, S. Sierra, J. M. Rodriguez, J. Boza, and J. Xaus.** 2007. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br. J. Nutr.* 98(S1):S96-100.

- Lara-Zarate, L., J. E. Lopez-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa.** 2011. *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor κ B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 51(5):313-318.
- Lazar, V., Y. Miyazaki, T. Hanawa, M. C. Chifiriuc, L. M. Ditu, L. Marutescu, C. Bleotu, and S. Kamiya.** 2009. The influence of some probiotic supernatants on the growth and virulence features expression of several selected enteroaggregative *E. coli* clinical strains. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 68(4):207-214.
- Lazar, V., M. C. Chifiriuc, D. E. Steward-Tull, C. Bleotu, D. Candlich, and A. C. Wardlaw.** 2010. Investigation of the cytotoxic capacity of some adherent opportunistic enterobacterial strains by the MTT assay and transmission electron microscopy. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 69(1):35-40.
- Lee JC, NE. Perez, CA. Hopkins, GB. Pier.** 1988. Purified capsular polysaccharide-induced immunity to *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect. Dis.* 157(4):723-30.
- Lee, S. J., S. S. Lee, N. H. Shim, J. U. Ok, H. S. Jung, G. M. Chu, I. H. Kim, and J. D. Kim.** 2009. Effects of dietary synbiotics from anaerobic microflora on growth performance, noxious gas emission and fecal pathogenic bacteria population in weaning pigs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 22:1202-1208.
- Le Maréchal C., G. Jan, S. Even, J. A. McCulloch, V. Azevedo, R. Thiery, E. Vautor, and Le Loir Y.** 2009. Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. *J. Microbiol. Methods* 79(1):131-136.
- Le Marechal, C., J. Jardin, G. Jan, S. Even, C. Pulido, J. M. Guibert, D. Hernandez, P. Francois, J. Schrenzel, D. Demon, E. Meyer, N. Berkova, R. Thiery, E. Vautor, and Le Loir Y.** 2011a. *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. *Vet. Res.* 42(1):35.
- Le Marechal, C., N. Seyffert, J. Jardin, D. Hernandez, G. Jan, L. Rault, V. Azevedo, P. Francois, J. Schrenzel, G. M. van de, S. Even, N. Berkova, R. Thiery, J. R. Fitzgerald, E. Vautor, and Le Loir Y.** 2011b. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS. One.* 6(11):e27354.
- Le Maréchal, C., R. Thiéry, E. Vautor, and Y. Le Loir.** 2011c. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-a review. *Dairy Sci. Technol.* 91:247-282.
- Le Marechal C., D. Hernandez, J. Schrenzel, S. Even, N. Berkova, R. Thiery, E. Vautor, J. R. Fitzgerald, P. Francois, and Le Loir Y.** 2011d. Genome sequences of two *Staphylococcus aureus* ovine strains that induce severe (strain O11) and mild (strain O46) mastitis. *J. Bacteriol.* 193:2353-2354.
- Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker.** 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72(4):728-764.

- Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker.** 2010a. Adaptation factors of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Benef. Microbes.* 1(4):335-342.
- Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker.** 2010b. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(3):171-184.
- Lebeer, S., I. Claes, H. L. Tytgat, T. L. Verhoeven, E. Marien, O. von, I. J. Reunanen, A. Palva, W. M. Vos, S. C. Keersmaecker, and J. Vanderleyden.** 2012. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(1):185-193.
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al.** 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 500(7464):541-546
- Lee, J. H., B. Lee, H. S. Lee, E. A. Bae, H. Lee, Y. T. Ahn, K. S. Lim, C. S. Huh, and D. H. Kim.** 2009. *Lactobacillus suntoryeus* inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF-kappaB activation in experimental colitis. *Int. J. Colorectal Dis.* 24(2):231-237.
- Lee, Y. K., K. Y. Puong, A. C. Ouwehand, and S. Salminen.** 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* 52(10):925-930.
- Le Loir Y., Baron F. and Gautier M.** 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2(1):63-76.
- Le Loir Y. and M. Gautier.** 2010. Monographie de microbiologie: *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. Tec&Doc.
- Li, J., W. Wang, S. X. Xu, N. A. Magarvey, and J. K. McCormick.** 2011b. *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108(8):3360-3365.
- Li, P., X. Ye, Z. Wang, Q. Yu, and Q. Yang.** 2010. [Effects of S-layer proteins from *lactobacillus* against *Salmonella typhimurium* adhesion and invasion on Caco-2 cells. *Wei Sheng Wu Xue. Bao.* 50(9):1226-1231.
- Li, X., W. G. Fusco, K. S. Seo, K. W. Bayles, E. E. Mosley, M. A. McGuire, and G. A. Bohach.** 2009. Epithelial Cell Gene Expression Induced by Intracellular *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Microbiol.* doi:10.1155/2009/753278
- Liang, X., and Y. Ji.** 2006. Alpha-toxin interferes with integrin-mediated adhesion and internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Cell Microbiol.* 8(10):1656-1668.
- Liang, X., and Y. Ji.** 2007. Comparative analysis of staphylococcal adhesion and internalization by epithelial cells. *Methods Mol. Biol.* 391:145-151.

- Liang, X., M. Yan, and Y. Ji.** 2009. The H35A mutated alpha-toxin interferes with cytotoxicity of staphylococcal alpha-toxin. *Infect. Immun.* 77(3):977-983.
- Liang, X., J. W. Hall, J. Yang, M. Yan, K. Doll, R. Bey, and Y. Ji.** 2011. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Hyperproduction of Alpha-Toxin in *Staphylococcus aureus*. *PLoS. One.* 6(4):e18428.
- Lievin-Le, M., V. R. Amsellem, and A. L. Servin.** 2011. Impairment of swimming motility by antidiarrheic *Lactobacillus acidophilus* strain LB retards internalization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within human enterocyte-like cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(10):4810-4820.
- Lin, W. H., C. R. Wu, T. J. Fang, M. S. Lee, K. L. Lin, H. C. Chen, S. Y. Huang, and Y. C. Hseu.** 2011. Adherent Properties and Macrophage Activation Ability of 3 Strains of Lactic Acid Bacteria. *J. Food Sci.* 76(1):M1-M7.
- Liu, J., Y. Luo, H. Ge, C. Han, H. Zhang, Y. Wang, J. Su, F. Quan, M. Gao, and Y. Zhang.** 2013. Anti-Bacterial Activity of Recombinant Human beta-Defensin-3 Secreted in the Milk of Transgenic Goats Produced by Somatic Cell Nuclear Transfer. *PLoS. One.* 8(6):e65379.
- Liu, Z., Y. Ma, J. Yang, P. Zhang, M. P. Moyer, and H. Qin.** 2011. Expression of the *Lactobacillus plantarum* surface layer MIMP protein protected NCM460 epithelial cells from enteroinvasive *Escherichia coli* infection. *Cell Physiol Biochem.* 27(1):99-108.
- Liu, Z., T. Shen, P. Zhang, Y. Ma, and H. Qin.** 2010. *Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein protects intestinal epithelial cells against tight junction injury induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Rep.* 38(5):3471-3480.
- Ljungh, A., and T. Wadstrom.** 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7(2):73-89.
- Lordermann U., K. Huebener, N. Jansen and H. Martens.** 2006. Effect of *Enterococcus faecium* as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 60:35-48.
- Loken, T.** 2001. Alternative therapy of animals--homeopathy and other alternative methods of therapy. *Acta Vet. Scand. Suppl* 95:47-50.
- Lorca, G., M. I. Torino, d. Font, V, and A. A. Ljungh.** 2002. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol. Lett.* 206(1):31-37.
- Loughman, A., T. Sweeney, F. M. Keane, G. Pietrocola, P. Speziale, and T. J. Foster.** 2008. Sequence diversity in the A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *BMC. Microbiol.* 8:74.
- Lowder, B.V., Guinane, C.M., Ben Zakour, N.L., Weinert, L.A., Conway-Morris, A., Cartwright, R.A., Simpson, A.J., Rambaut, A., Nubel, U., Fitzgerald, J.R.,** 2009.

Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(46):19545-19550.

Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339(8):520-532.

Lowy, F. D. 2000. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? Trends Microbiol. 8(8):341-343.

Lowy, F. D. 2011. How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. N. Engl. J. Med. 364(21):1987-1990.

M

Machado, V. S., G. Oikonomou, M. L. Bicalho, W. A. Knauer, R. Gilbert, and R. C. Bicalho. 2012. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. Vet. Microbiol. 159(3-4):460-469.

Mack, D. R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall, and M. A. Hollingsworth. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. Am. J. Physiol 276(1):G941-G950.

MacPhee, R. A., R. Hummelen, J. E. Bisanz, W. L. Miller, and G. Reid. 2010. Probiotic strategies for the treatment and prevention of bacterial vaginosis. Expert. Opin. Pharmacother. 11(18):2985-2995.

Mamo, W., and G. Froman. 1994. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells induced by growth in milk whey. Microbiol. Immunol. 38(4):305-308.

Marco, M. L., S. Pavan, and M. Kleerebezem. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. Curr. Opin. Biotechnol. 17(2):204-210.

Marcone, V., G. Rocca, M. Lichtner, and E. Calzolari. 2010. Long-term vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* as a complementary approach to management of bacterial vaginosis. Int. J. Gynaecol. Obstet. 110(3):223-226.

Marteau, P., M. Minekus, R. Havenaar, and i. Huis, V. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. J. Dairy Sci. 80(6):1031-1037.

Martinez, B., J. Sillanpaa, E. Smit, T. K. Korhonen, and P. H. Pouwels. 2000. Expression of *cbsA* encoding the collagen-binding S-protein of *Lactobacillus crispatus* JCM5810 in *Lactobacillus casei* ATCC 393(T). J. Bacteriol. 182(23):6857-6861.

Martinez-Pulgarin, S., G. Dominguez-Bernal, J. A. Orden, and F. R. de la. 2009. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. Microbiology 155(5):1505-1515.

- Masood, M. I., M. I. Qadir, J. H. Shirazi, and I. U. Khan.** 2011. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit Rev. Microbiol.* 37(1):91-98.
- Mather, I. H., and T. W. Keenan.** 1998a. Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 3(3):259-273.
- Mather, I. H., and T. W. Keenan.** 1998b. The cell biology of milk secretion: historical notes. Introduction. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 3(3):227-232.
- Matthews KR, Rejman JJ, Turner JD, Oliver SP.** 1994. Proliferation of a bovine mammary epithelial cell line in the presence of bacterial virulence factors. *J. Dairy. Sci.* 77(10):2959-2964.
- Maudsdotter, L., H. Jonsson, S. Roos, and A. B. Jonsson.** 2011. Lactobacilli reduce cell cytotoxicity caused by *Streptococcus pyogenes* by producing lactic acid that degrades the toxic component lipoteichoic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(4):1622-1628.
- Maze, A., G. Boel, M. Zuniga, A. Bourand, V. Loux, M. J. Yebra, V. Monedero, K. Correia, N. Jacques, S. Beaufils, S. Poncet, P. Joyet, E. Milohanic, S. Casaregola, Y. Auffray, G. Perez-Martinez, J. F. Gibrat, M. Zagorec, C. Francke, A. Hartke, and J. Deutscher.** 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J. Bacteriol.* 192(10):2647-2648.
- Mazmanian SK, G. Liu, H. Ton-That, O. Schneewind.** 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science.* 285(5428):760-763
- McCarthy, A.J., Lindsay, J.A., Loeffler, A.,** 2012. Are all meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet. Dermatol.* 23:267-274.
- McClenahan, D. J., J. P. Sotos, and C. J. Czuprynski.** 2005. Cytokine response of bovine mammary gland epithelial cells to *Escherichia coli*, coliform culture filtrate, or lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.* 66(9):1590-1597.
- McCormick, B. A.** 2003. The use of transepithelial models to examine hostpathogen nteractions. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:77-81.
- McDougall S, Parker KI, Heuer C, Compton CW.** 2009. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Vet Microbiol.* 134(1-2):177-185.
- McFarland, L. V.** 2011. Emerging therapies for *Clostridium difficile* infections. *Expert. Opin. Emerg. Drugs* 16(3):425-439.
- McMillan, A., M. Dell, M. P. Zellar, S. Cribby, S. Martz, E. Hong, J. Fu, A. Abbas, T. Dang, W. Miller, and G. Reid.** 2011. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 86(1):58-64.

- Medellin-Pena, M. J., H. Wang, R. Johnson, S. Anand, and M. W. Griffiths.** 2007. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(13):4259-4267.
- Medellin-Pena, M. J., and M. W. Griffiths.** 2009. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(4):1165-1172.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr.** 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 9(1):4-9.
- Melchior, M. B., H. Vaarkamp, and J. Fink-Gremmels.** 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 171(3):398-407.
- Melo, M. N., and M. A. Castanho.** 2007. Omigaman interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768(5):1277-1290.
- Mempel, M., C. Schnopp, M. Hojka, H. Fesq, S. Weidinger, M. Schaller, H. C. Korting, J. Ring, and D. Abeck.** 2002. Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br. J. Dermatol.* 146(6):943-951.
- Mengheri, E.** 2008. Health, probiotics, and inflammation. *J. Clin. Gastroenterol.* 42 (S3):S177-S178.
- Menzies, B. E., and I. Kourteva.** 1998. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.* 66(12):5994-5998.
- Menzies, B. E., and I. Kourteva.** 2000. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29(1):39-45.
- Mercenier, A., S. Pavan, and B. Pot.** 2003. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* 9(2):175-191.
- Merk, K., C. Borelli, and H. C. Korting.** 2005. Lactobacilli - bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. *Int. J. Med. Microbiol.* 295(1):9-18.
- Middleton, J. R., C. D. Luby, and D. S. Adams.** 2009. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):192-198.
- Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR.** 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 102(8):2880-2885.
- Moisan, H., E. Brouillette, C. L. Jacob, P. Langlois-Begin, S. Michaud, and F. Malouin.** 2006. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* 188(1):64-76.

- Mombelli, B., and M. R. Gismondo.** 2000. The use of probiotics in medical practice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16(4):531-536.
- Monteagudo-Mera, A., I. Caro, L. B. Rodriguez-Aparicio, J. Rua, M. A. Ferrero, and M. R. Garcia-Armesto.** 2011. Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *J. Food Prot.* 74(8):1379-1386.
- Morelli, L.** 2000. *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1(2):59-67.
- Mork, T., H. J. Jorgensen, M. Sunde, B. Kvitle, S. Sviland, S. Waage, and T. Tollersrud.** 2012. Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. *Vet. Microbiol.* 159(1-2):171-180.
- Moslehi-Jenabian, S., L. L. Pedersen, and L. Jespersen.** 2010. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients.* 2(4):449-473.
- Mottola C, Gennaro R, Marzullo A, Romeo D.** 1980. Isolation and partial characterization of the plasma membrane of purified bovine neutrophils. *Eur J Biochem.* 111(2):341-6.
- Mulcahy, M. E., J. A. Geoghegan, I. R. Monk, K. M. O'Keeffe, E. J. Walsh, T. J. Foster, and R. M. McLoughlin.** 2012. Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. *PLoS. Pathog.* 8(12):e1003092.
- Mullarky, I. K., C. Su, N. Frieze, Y. H. Park, and L. M. Sordillo.** 2001. *Staphylococcus aureus* agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infect. Immun.* 69(1):45-51.
- Munoz-Provencio, D., G. Perez-Martinez, and V. Monedero.** 2010. Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *J. Appl. Microbiol.* 108(3):1050-1059.
- Munoz-Provencio, D., and V. Monedero.** 2011. Shotgun phage display of *Lactobacillus casei* BL23 against collagen and fibronectin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(2):197-203.
- Munoz-Provencio, D., J. Rodriguez-Diaz, M. C. Collado, P. Langella, L. G. Bermudez-Humaran, and V. Monedero.** 2012. Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(24):8684-8693.
- Murray, R. J.** 2005a. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern. Med. J.* 35(S2):S106-S119.
- Murray, R. J.** 2005b. *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: diagnosis and management guidelines. *Intern. Med. J.* 35(S2):S25-S44.
- Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader.** 2010. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care.* 33(10):2277-2284.

N

- Nader-Macias, M. E., M. C. Otero, M. C. Espeche, and N. C. Maldonado.** 2008. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35(11):1387-1395.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer.** 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90(1):E17-E38.
- Nagpal, R., P. V. Behare, M. Kumar, D. Mohania, M. Yadav, S. Jain, S. Menon, O. Parkash, F. Marotta, E. Minelli, C. J. Henry, and H. Yadav.** 2012a. Milk, milk products, and disease free health: an updated overview. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* 52(4):321-333.
- Nagpal, R., A. Kumar, M. Kumar, P. V. Behare, S. Jain, and H. Yadav.** 2012b. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.* 334(1):1-15.
- Nair, S. P., M. Bischoff, M. M. Senn, and B. Berger-Bachi.** 2003. The sigma B regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. *Infect. Immun.* 71(7):4167-4170.
- Nava, G. M., L. R. Bielke, T. R. Callaway, and M. P. Castaneda.** 2005. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim. Health Res. Rev.* 6(1):105-118.
- Nayak, S. K.** 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish. Shellfish. Immunol.* 29(1):2-14.
- Neal-McKinney, J. M., X. Lu, T. Duong, C. L. Larson, D. R. Call, D. H. Shah, and M. E. Konkel.** 2012. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS. One.* 7(9):e43928.
- Newbould, F. H.** 1974. Antibiotic treatment of experimental *Staphylococcus aureus* infections of the bovine mammary gland. *Can. J. Comp Med.* 38(4):411-416.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S.** 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 336(6086):1262-7.
- Nickerson, S. C.** 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187(1):41-45.
- Nickerson, S. C.** 1987. Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191(11):1484-1488.
- Nickerson, S. C., J. L. Watts, R. L. Boddie, and C. H. Ray.** 1990. Effect of postmilking teat antiseptics on teat canal infections in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73(2):373-380.

- Nickerson, S. C.** 2009. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment-an overview. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):128-135.
- Nilsen, H., H. G. Olsen, B. Hayes, T. Nome, E. Sehested, M. Svendsen, T. H. Meuwissen, and S. Lien.** 2009. Characterization of a QTL region affecting clinical mastitis and protein yield on BTA6. *Anim Genet.* 40(5):701-712.
- Nocek, J. E.** 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80(5):1005-1028.
- Nomoto, K.** 2005. Prevention of infections by probiotics. *J. Biosci. Bioeng.* 100(6):583-592.
- Notebaert, S., and E. Meyer.** 2006. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review. *Vet. Q.* 28(1):2-13.
- Nouaille, S., S. Even, C. Charlier, Le Loir Y., M. Coccagn-Bousquet, and P. Loubiere.** 2009. Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(13):4473-4482.
- Novick, R. P.** 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49(2):93-105.
- Novick, R. P., G. E. Christie, and J. R. Penades.** 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(8):541-551.

O

- O'Bryan, C. A., P. G. Crandall, and S. C. Ricke.** 2008. Organic poultry pathogen control from farm to fork. *Foodborne. Pathog. Dis.* 5(6):709-720.
- O'Flaherty, S. J., and T. R. Klaenhammer.** 2010. Functional and phenotypic characterization of a protein from *Lactobacillus acidophilus* involved in cell morphology, stress tolerance and adherence to intestinal cells. *Microbiology* 156(11):3360-3367.
- O'Hara, A. M., and F. Shanahan.** 2007. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *ScientificWorldJournal.* 7:31-46.
- O'Sullivan, G. C., P. Kelly, S. O'Halloran, C. Collins, J. K. Collins, C. Dunne, and F. Shanahan.** 2005. Probiotics: an emerging therapy. *Curr. Pharm. Dis.* 11(1):3-10.
- Ocana, V. S., and M. E. Nader-Macias.** 2002. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. *Br. J. Biomed. Sci.* 59(4):183-190.
- Ochoa-Zarzosa, A., P. D. Loeza-Lara, F. Torres-Rodriguez, H. Loeza-Angeles, N. Mascot-Chiquito, S. Sanchez-Baca, and J. E. Lopez-Meza.** 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(2):199-206.

- Ochoa-Zarzosa, A., E. Villarreal-Fernandez, H. Cano-Camacho, and J. E. Lopez-Meza.** 2009. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb. Pathog.* 47(1):1-7.
- Ogawa, S. K., E. R. Yurberg, V. B. Hatcher, M. A. Levitt, and F. D. Lowy.** 1985. Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 50(1):218-224.
- Ohashi, Y., and K. Ushida.** 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim Sci. J.* 80(4):361-371.
- Oikonomou, G., V. S. Machado, C. Santisteban, Y. H. Schukken, and R. C. Bicalho.** 2012. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS. One.* 7(10):e47671.
- Oliveira, M., R. Bexiga, S. F. Nunes, C. Carneiro, L. M. Cavaco, F. Bernardo, and C. L. Vilela.** 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 118(1-2):133-140.
- Oliveira, M., R. Bexiga, S. F. Nunes, and C. L. Vilela.** 2011. Invasive potential of biofilm-forming *Staphylococci* bovine subclinical mastitis isolates. *J. Vet. Sci.* 12(1):95-97.
- Opdebeeck, J. P.** 1982. Mammary gland immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181(10):1061-1065.
- Opdebeeck, J. P., A. J. Frost, and D. O'Boyle.** 1988. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 16(1):77-86.
- Otero, M. C., V. S. Ocana, and M. Elena Nader-Macias.** 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. *Methods Mol. Biol.* 268:435-440.
- Otero, M. C., L. Morelli, and M. E. Nader-Macias.** 2006a. Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(1):91-97.
- Otero, M. C., and M. E. Nader-Macias.** 2006b. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96(1-2):35-46.
- Otto, M.** 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64:175-188.
- Ouwehand AC, S. Salminen, E. Isolauri.** 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82(1-4):279-89.
- Oviedo-Boyso J, JJ. Valdez-Alarcón, M. Cajero-Juárez, A. Ochoa-Zarzosa, JE. López-Meza, A. Bravo-Patiño, VM. Baizabal-Aguirre.** 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54(4):399-409.

Oviedo-Boyso, J., J. G. Barriga-Rivera, J. J. Valdez-Alarcon, A. Bravo-Patino, A. Carabez-Trejo, M. Cajero-Juarez, and V. M. Baizabal-Aguirre. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *Scand. J. Immunol.* 67(2):169-176.

Oviedo-Boyso, J., R. Cortes-Vieyra, A. Huante-Mendoza, H. B. Yu, J. J. Valdez-Alarcon, A. Bravo-Patino, M. Cajero-Juarez, B. B. Finlay, and V. M. Baizabal-Aguirre. 2011. The PI3K-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect. Immun.* 79(11):4569-4577.

P

Paape, M. J., and W. P. Wergin. 1977. The leukocyte as a defense mechanism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170(10):1214-1223.

Paape, M. J., W. P. Wergin, A. J. Guidry, and W. D. Schultze. 1981. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 137:555-578.

Paape, M. J., K. Shafer-Weaver, A. V. Capuco, O. K. Van, and C. Burvenich. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:259-277.

Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux, and C. Burvenich. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 7(2):109-121.

Paape, M. J., D. D. Bannerman, X. Zhao, and J. W. Lee. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34(5):597-627.

Pan, S. J., C. H. Kuo, K. P. Lam, Y. T. Chu, W. L. Wang, and C. H. Hung. 2010. Probiotics and allergy in children--an update review. *Pediatr. Allergy Immunol.* 21(4):e659-e666.

Panwar, H., H. M. Rashmi, V. K. Batish, and S. Grover. 2013. Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes - prospects and perspectives. *Diabetes Metab Res. Rev.* 29(2):103-112.

Park, W. B., J. H. Lee, J. H. Jeon, S. J. Lee, S. H. Kim, N. J. Kim, H. B. Kim, M. D. Oh, and K. W. Choe. 2008. Effect of tumor necrosis factor-alpha on intracellular *Staphylococcus aureus* in vascular endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52(2):247-252.

Parvez, S., K. A. Malik, K. S. Ah, and H. Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100(6):1171-1185.

Patti, J. M., B. L. Allen, M. J. McGavin, and M. Hook. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:585-617.

- Paulrud, C. O.** 2005. Basic concepts of the bovine teat canal. *Vet. Res. Commun.* 29(3):215-245.
- Peacock, S. J., T. J. Foster, B. J. Cameron, and A. R. Berendt.** 1999. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145 (12):3477-3486.
- Pearson, L. J., and E. H. Marth.** 1990. *Listeria monocytogenes*--threat to a safe food supply: a review. *J. Dairy Sci.* 73(4):912-928.
- Peek, H. W., and W. J. Landman.** 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Q.* 31(3):143-161.
- Peng, H., J. Q. Wang, H. Y. Kang, S. H. Dong, P. Sun, D. P. Bu, and L. Y. Zhou.** 2012. Effect of feeding *Bacillus subtilis* natto fermentation product on milk production and composition, blood metabolites and rumen fermentation in early lactation dairy cows. *J. Anim Physiol Anim Nutr.* 96(3):506-512.
- Penna, F. J., L. A. Peret, L. Q. Vieira, and J. R. Nicoli.** 2008. Probiotics and mucosal barrier in children. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 11(5):640-644.
- Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero, and N. Gobbato.** 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* 78(7):1597-1606.
- Pereira, U. P., D. G. Oliveira, L. R. Mesquita, G. M. Costa, and L. J. Pereira.** 2010. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Vet. Microbiol.* 148(2-4):117-124.
- Peton, V., and Le Loir Y.** 2013. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.011.
- Piccinini, R., L. Cesaris, V. Dapra, V. Borromeo, C. Picozzi, C. Secchi, and A. Zecconi.** 2009. The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *J. Dairy Res.* 76(1):36-41.
- Piccinini, R., V. Borromeo, and A. Zecconi.** 2010. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Vet. Microbiol.* 145(1-2):100-105.
- Pighetti GM and AA. Elliott.** 2011. Gene polymorphisms: the keys for marker assisted selection and unraveling core regulatory pathways for mastitis resistance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16(4):421-32.
- Parassol, N., M. Freitas, K. Thoreux, G. Dalmasso, R. Bourdet-Sicard, and P. Rampal.** 2005. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res. Microbiol.* 156:256-262.
- Pizarro-Cerda, J., and P. Cossart.** 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:715-727.

- Porcherie, A., P. Cunha, A. Trotureau, P. Roussel, F. B. Gilbert, P. Rainard, and P. Germon.** 2012. Répertoire of *Escherichia coli* agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells. *Vet. Res.* 43(1):14.
- Postle DS, M. Roguinsky and B. Poutrel.** 1978. Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. *Clin Genet.* 13(2):233-236.
- Poutrel, B., Lerondelle, C.,** 1978. Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. Influence of the month of lactation and other factors related to the cow. *Ann. Rech. Vet.* 9(1):119-128.
- Poutrel, B.** 1982. Susceptibility to mastitis: a review of factors related to the cow. *Ann. Rech. Vet.* 13(1):85-99.
- Prasad, L. B., and F. H. Newbould.** 1968. Initial response of the bovine mammary gland to invasion by *Staphylococcus aureus*. *Can. Vet. J.* 9(8):170-177.
- Preidis, G. A., C. Hill, R. L. Guerrant, B. S. Ramakrishna, G. W. Tannock, and J. Versalovic.** 2011. Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology* 140(1):8-14.
- Prescott, S. L., and B. Bjorksten.** 2007. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120(2):255-262.
- Prevost, G., Colin, D.A., Staali, L., Baba, M.L., Gravet, A., Werner, S., Sanni, A., Meunier, O., Monteil, H.,** 1998. Pore-forming leukotoxins from *Staphylococcus aureus*: variability of the target cells and 2 pharmacological processes. *Pathol. Biol.* 46:435-441.
- Prince, T., A. J. McBain, and C. A. O'Neill.** 2012. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus* Induced Cell Death by Competitive Exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(15):5119-5126.
- Proctor, R. A., G. Christman, and D. F. Mosher.** 1984. Fibronectin-induced agglutination of *Staphylococcus aureus* correlates with invasiveness. *J. Lab Clin. Med.* 104(4):455-469.
- Proctor, R. A., E. C. von, B. C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, and G. Peters.** 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(4):295-305.
- Pyorala, S.** 2002. New strategies to prevent mastitis. *Reprod. Domest. Anim.* 37(4):211-216.
- Pyorala, S.** 2008. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43(S2):252-259.
- Pyörälä S and S. Taponen.** 2009. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 134(1-2):3-8.

Q

- Qazi, S. N., E. Counil, J. Morrissey, C. E. Rees, A. Cockayne, K. Winzer, W. C. Chan, P. Williams, and P. J. Hill.** 2001. agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect. Immun.* 69(11):7074-7082.
- Qazi, S. N., S. E. Harrison, T. Self, P. Williams, and P. J. Hill.** 2004. Real-time monitoring of intracellular *Staphylococcus aureus* replication. *J. Bacteriol.* 186(4):1065-1077.
- Quin T.** 1980. Dairy farm management. Delmar publishers Alabama. NewYork.

R

- Rabot, A., O. Wellnitz, H. H. Meyer, and R. M. Bruckmaier.** 2007. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. *J. Dairy Res.* 74(1):93-99.
- Rainard, P., and B. Poutrel.** 1988. Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49(3):327-329.
- Rainard, P.** 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet. Res.* 34(5):647-670.
- Rainard, P., J. C. Corrales, M. B. Barrio, T. Cochard, and B. Poutrel.** 2003. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10(2):272-277.
- Rainard, P.** 2005. Tackling mastitis in dairy cows. *Nat. Biotechnol.* 23(4):430-432.
- Rainard, P., and C. Riollet.** 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37(3):369-400.
- Rainard, P.** 2007. *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F' is secreted and stimulates neutralising antibody response in the course of intramammary infection. *Vet. Res.* 38(5):685-696.
- Rainard, P., P. Cunha, S. Bougarn, A. Fromageau, C. Rossignol, F. B. Gilbert, and P. Berthon.** 2013. T helper 17-associated cytokines are produced during antigen-specific inflammation in the mammary gland. *PLoS. One.* 8(5):e63471.
- Rajilić-Stojanović M.** 2013. Function of the microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27(1):5-16.

- Rasigade, J. P., A. Moulay, Y. Lhoste, A. Tristan, M. Bes, F. Vandenesch, J. Etienne, G. Lina, F. Laurent, and O. Dumitrescu.** 2011. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 11:263.
- Reed, S. B., C. A. Wesson, L. E. Liou, W. R. Trumble, P. M. Schlievert, G. A. Bohach, and K. W. Bayles.** 2001. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect. Immun.* 69(3):1521-1527.
- Reid, G., J. A. McGroarty, R. Angotti, and R. L. Cook.** 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can. J. Microbiol.* 34(3):344-351.
- Reid, G.** 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9):3763-3766.
- Reid, G.** 2002. Safety of *lactobacillus* strains as probiotic agents. *Clin. Infect. Dis.* 35(3):349-350.
- Reid, G., and J. Burton.** 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microb. Infect.* 4(3):319-324.
- Reid, G., and R. Friendship.** 2002. Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Anim Biotechnol.* 13(1):97-112.
- Reid, G., M. E. Sanders, H. R. Gaskins, G. R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall, M. Roberfroid, I. Rowland, C. Cherbut, and T. R. Klaenhammer.** 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 37(2):105-118.
- Reid, G.** 2006. Probiotics to prevent the need for, and augment the use of, antibiotics. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17(5):291-295.
- Reid, G., S. O. Kim, and G. A. Kohler.** 2006. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46(2):149-157.
- Reid, G.** 2008. How science will help shape future clinical applications of probiotics. *Clin. Infect. Dis.* 46(S2):S62-S66.
- Reid, G.** 2012. Probiotic and prebiotic applications for vaginal health. *J. AOAC Int.* 95(1):31-34.
- Reid, G., E. Gaudier, F. Guarner, G. B. Huffnagle, J. M. Macklaim, A. M. Munoz, M. Martini, T. Ringel-Kulka, B. Sartor, R. Unal, K. Verbeke, and J. Walter.** 2010. Responders and non-responders to probiotic interventions: how can we improve the odds? *Gut Microbes.* 1(3):200-204.
- Reilly, S. S., M. C. Hudson, J. F. Kellam, and W. K. Ramp.** 2000. In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone* 26(1):63-70.

- Remus, D. M., M. Kleerebezem, and P. A. Bron.** 2011. An intimate tete-a-tete - how probiotic lactobacilli communicate with the host. *Eur. J. Pharmacol.* 668(S1):S33-S42.
- Ren, D., C. Li, Y. Qin, R. Yin, X. Li, M. Tian, S. Du, H. Guo, C. Liu, N. Zhu, D. Sun, Y. Li, and N. Jin.** 2012. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe.* 18(5):508-515.
- Reunanen, J., O. von, I. A. P. Hendrickx, A. Palva, and W. M. de Vos.** 2012. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(7):2337-2344.
- Reuter, G.** 2001. [Probiotics--possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114(11-12):410-419.
- Rinaldi, M., R. W. Li, D. D. Bannerman, K. M. Daniels, C. Evock-Clover, M. V. Silva, M. J. Paape, R. B. Van, C. Burvenich, and A. V. Capuco.** 2010a. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct. Integr. Genomics* 10(1):21-38.
- Rinaldi, M., R. W. Li, and A. V. Capuco.** 2010b. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138(4):267-279.
- Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel.** 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:247-258.
- Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel.** 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84(5):1077-1084.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E.,** 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77(11):3354-3364.
- Robyn, J., G. Rasschaert, W. Messens, F. Pasmans, and M. Heyndrickx.** 2012. Screening for lactic acid bacteria capable of inhibiting *Campylobacter jejuni* in *in vitro* simulations of the broiler chicken caecal environment. *Benef. Microbes* 3(4):299-308.
- Rochat, T., L. Bermudez-Humaran, J. J. Gratadoux, C. Fourage, C. Hoebler, G. Corthier, and P. Langella.** 2007. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb. Cell Fact.* 6:22.
- Rodrigues, A. C., and P. L. Ruegg.** 2005. Actions and outcomes of Wisconsin dairy farms completing milk quality teams. *J. Dairy Sci.* 88(7):2672-2680.
- Rodriguez, C., J. V. Cofre, M. Sanchez, P. Fernandez, G. Boggiano, and E. Castro.** 2011. Lactobacilli isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during progestronic stage of estrous cycle. *Anaerobe.* 17(1):15-18.

- Roosjakkars, S.H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.**, 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol.* 6, 920-927.
- Ruas-Madiedo, P., M. Medrano, N. Salazar, De Los Reyes-Gavilan CG, P. F. Perez, and A. G. Abraham.** 2010. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *J. Appl. Microbiol.* 109(6):2079-2086.
- Ruegg, P. L.** 2009. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *J. Anim. Sci.* 87(S13):43-55.
- Ruiz, F. O., G. Gerbaldo, P. Asurmendi, L. M. Pascual, W. Giordano, and I. L. Barberis.** 2009. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *lactobacillus* strains. *Curr. Microbiol.* 59(5):497-501.
- Rupp, R., and D. Boichard.** 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 34(5):671-688.
- Rupp, R., D. Bergonier, S. Dion, M. C. Hygonenq, M. R. Aurel, C. Robert-Granie, and G. Foucras.** 2009. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *J. Dairy Sci.* 92(3):1203-1219.
- Ryan, K. A., T. Jayaraman, P. Daly, C. Canchaya, S. Curran, F. Fang, E. M. Quigley, and P. W. O'Toole.** 2008. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(4):269-274.
- Rycroft, C. E., L. J. Fooks, and G. R. Gibson.** 1999. Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 2(6):481-484.

S

- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, and T. Mattila-Sandholm.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84(3):197-215.
- Sadowska, B., E. Walencka, M. Wieckowska-Szakiel, and B. Rozalska.** 2010. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol. (Praha)* 55(5):497-501.
- Sakwinska, O., Giddey, M., Moreillon, M., Morisset, D., Waldvogel, A., Moreillon, P.,** 2011. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(17):5908–5915.
- Saha, S., C. Tomaro-Duchesneau, M. Tabrizian, and S. Prakash.** 2012. Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 12(9):1207-1220.

- Sahana, G., M. S. Lund, L. Andersson-Eklund, N. Hastings, A. Fernandez, T. Iso-Touru, B. Thomsen, S. Viitala, P. Sorensen, J. L. Williams, and J. Vilkki.** 2008. Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Anim. Genet.* 39(4):354-362.
- Salim, H. M., H. K. Kang, N. Akter, D. W. Kim, J. H. Kim, M. J. Kim, J. C. Na, H. B. Jong, H. C. Choi, O. S. Suh, and W. K. Kim.** 2013. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 92(8):2084-2090.
- Salminen, S., W. A. von, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland, and T. Mattila-Sandholm.** 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44(1-2):93-106.
- Samuelsen, O., H. H. Haukland, B. C. Kahl, E. C. von, R. A. Proctor, H. Ulvatne, K. Sandvik, and L. H. Vorland.** 2005. *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferricin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 56(6):1126-1129.
- Sanchez, B., and M. C. Urdaci.** 2012. Extracellular proteins from *Lactobacillus plantarum* BMCM12 prevent adhesion of enteropathogens to mucin. *Curr. Microbiol.* 64(6):592-596.
- Sandberg, A., S. Lemaire, B. F. Van, P. M. Tulkens, D. Hughes, E. C. von, and N. Frimodt-Moller.** 2011. Intra- and extracellular activity of dicloxacillin and linezolid against a clinical *Staphylococcus aureus* strain with small-colony variant phenotype in an in vitro (THP-1 macrophages) and an in vivo (mouse peritonitis) model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(4):1443-1452.
- Sanders, M. E.** 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* 130(S2):384S-390S.
- Sanders, M. E., and T. R. Klaenhammer.** 2001. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* 84(2):319-331.
- Sanders, M. E., L. M. Akkermans, D. Haller, C. Hammerman, J. Heimbach, G. Hormannspurger, G. Huys, D. D. Levy, F. Lutgendorff, D. Mack, P. Phothirath, G. Solano-Aguilar, and E. Vaughan.** 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 1(3):164-185.
- Sandholm, M., L. Kaartinen, and S. Pyorala.** 1990. Bovine mastitis--why does antibiotic therapy not always work? An overview. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13(3):248-260.
- Saxelin, M., S. Tynkkynen, T. Mattila-Sandholm, and W. M. de Vos.** 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16(2):204-211.

- Scarpellini, E., M. Campanale, D. Leone, F. Purchiaroni, G. Vitale, E. C. Lauritano, and A. Gasbarrini.** 2010. Gut microbiota and obesity. *Intern. Emerg. Med.* 5(S1):S53-S56.
- Schachtsiek, M., W. P. Hammes, and C. Hertel.** 2004. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12):7078-7085.
- Scharek L., J. Guth, M. Filter and M.F.G. Schmidt.** 2007. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* varatoyoi NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 61:223-234.
- Schmidt, A. L., S. P. Oliver, and M. E. Fydenkevez.** 1984. Evaluation of experimental teat dip containing sodium chlorite and lactic acid by excised teat assay. *J. Dairy Sci.* 67(12):3075-3080.
- Schmidt, F., S. S. Scharf, P. Hildebrandt, M. Burian, J. Bernhardt, V. Dhople, J. Kalinka, M. Gutjahr, E. Hammer, and U. Volker.** 2010. Time-resolved quantitative proteome profiling of host-pathogen interactions: the response of *Staphylococcus aureus* RN1HG to internalisation by human airway epithelial cells. *Proteomics.* 10(15):2801-2811.
- Schwarz, D., U. S. Diesterbeck, K. Failing, S. Konig, K. Brugemann, M. Zschock, W. Wolter, and C. P. Czerny.** 2010. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany-A longitudinal study. *J. Dairy Sci.* 93(12):5716-5728.
- Sears PM, Smith BS, Stewart WK, Gonzalez RN, Rubino SD, Gusik SA, Kulisek ES, Projan SJ, Blackburn P.** 1992. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J Dairy Sci.* 75(11):3185-90.
- Seegers H., C. Fourichon and F. Beaudeau.** 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475-491.
- Sendi, P., and R. A. Proctor.** 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* 17(2):54-58.
- Senft, B., and J. Neudecker.** 1991. [Defense mechanisms of the bovine mammary gland]. *Tierarztl. Prax.* 19(4):357-363.
- Servin, A. L.** 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(4):405-440.
- Servin, A. L., and M. H. Coconnier.** 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5):741-754.
- Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH, Cullor JS.** 1993. Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-

- defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 25;268(9):6641-6648.
- Seykora, A. J., and B. T. McDaniel.** 1985. Udder and teat morphology related to mastitis resistance: a review. *J. Dairy Sci.* 68(8):2087-2093.
- Shen, J., M. S. Obin, and L. Zhao.** 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34(1):39-58.
- Sherman, P. M., K. C. Johnson-Henry, H. Yeung, P. Ngo, J. Goulet, and T. A. Tompkins.** 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect. Immun.* 73:5183–5188.
- Shinji, H., Y. Yosizawa, A. Tajima, T. Iwase, S. Sugimoto, K. Seki, and Y. Mizunoe.** 2011. Role of FnBPA and FnBPB on *in vitro* cellular and *in vivo* septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79(6):2215-2223.
- Sidira, M., A. Galanis, P. Ypsilantis, A. Karapetsas, Z. Progaki, C. Simopoulos, and Y. Kourkoutas.** 2010. Effect of probiotic-fermented milk administration on gastrointestinal survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and modulation of intestinal microbial flora. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 19(4):224-230.
- Simianer H., H. Solbu, L.R. Schaeffer.** 1991. Estimated genetic correlations between disease and yield traits in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 74(12):4358-65.
- Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann, and K. H. Krause.** 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol.* 1(2):101-117.
- Sinha, B., P. Francois, Y. A. Que, M. Hussain, C. Heilmann, P. Moreillon, D. Lew, K. H. Krause, G. Peters, and M. Herrmann.** 2000a. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.* 68(12):6871-6878.
- Sinha, B., M. Herrmann, and K. H. Krause.** 2000b. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol.* 8(8):343-344.
- Sinha, B., and M. Fraunholz.** 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(2-3):170-175.
- Siivonen J., S. Taponen, Hovinen M., Pastell M., Lensinke B.J., Pyörälä S., L. Hänninen.** 2011. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Applied Animal Behaviour Sci.* 132:101-106.
- Skoufos I, Voidarou Ch, Bezirtzoglou E, Tzora A.** 2006. Effects of machine-milking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 53(10):499-501.

- Sladek, Z., D. Rysanek, H. Ryznarova, and M. Faldyna.** 2005. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet. Res.* 36(4):629-643.
- Soares, J., C. Lopes, F. Tavaría, L. Delgado, and M. Pintado.** 2013. A diversity profile from the staphylococcal community on atopic dermatitis skin: a molecular approach. *J. Appl. Microbiol.* 115(6):1411-1419.
- Solis, B., S. Samartin, S. Gomez, E. Nova, R. B. de la, and A. Marcos.** 2002. Probiotics as a help in children suffering from malnutrition and diarrhoea. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (S3):S57-S59.
- Son, J. S., E. B. Kim, S. J. Lee, S. Y. Jun, S. J. Yoon, S. H. Kang, and Y. J. Choi.** 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* derived from bovine mastitis and isolation of two lytic bacteriophages. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56(4):347-353.
- Soong, G., F. J. Martin, J. Chun, T. S. Cohen, D. S. Ahn, and A. Prince.** 2011. *Staphylococcus aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity. *J. Biol. Chem.* 286(41):35891-35898.
- Sordillo, L. M., S. C. Nickerson, and R. M. Akers.** 1989. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. *J. Dairy Sci.* 72(1):228-240.
- Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver, and D. DeRosa.** 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80(8):1851-1865.
- Sordillo, L. M., and K. L. Streicher.** 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 7(2):135-146.
- Sordillo, L. M.** 2011. New concepts in the causes and control of mastitis. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 16(4):271-273.
- Sorg, D., K. Danowski, V. Korenkova, V. Rusnakova, R. Kuffner, R. Zimmer, H. H. Meyer, and H. Kliem.** 2013. Microfluidic high-throughput RT-qPCR measurements of the immune response of primary bovine mammary epithelial cells cultured from milk to mastitis pathogens. *Animal.* 7(5):799-805.
- Spurbeck, R. R., and C. G. Arvidson.** 2010. *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* 78(7):3103-3111.
- Spurbeck, R. R., and C. G. Arvidson.** 2011. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol.* 6(5):567-582.
- Steenefeld, W., W. T. van, H. W. Barkema, and H. Hogeveen.** 2011. Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach. *J. Dairy Sci.* 94(1):174-188.
- Stein, H. H., and D. Y. Kil.** 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. *Anim. Biotechnol.* 17(2):217-231.

- Ster, C., F. B. Gilbert, T. Cochard, and B. Poutrel.** 2005. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol. Cell Probes* 19(4):227-235.
- Stern, N. J., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Pereygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. D. Pokhilenko, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, and B. S. Seal.** 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(9):3111-3116.
- Stober, H., E. Maier, and H. Schmidt.** 2010. Protective effects of Lactobacilli, Bifidobacteria and Staphylococci on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes are strain-specific. *Int. J. Food Microbiol.* 144(1):133-140.
- Stout, V. G., and J. J. Iandolo.** 1990. Chromosomal gene transfer during conjugation by *Staphylococcus aureus* is mediated by transposon-facilitated mobilization. *J. Bacteriol.* 172(10):6148-6150.
- Strandberg, Y., C. Gray, T. Vuocolo, L. Donaldson, M. Broadway, and R. Tellam.** 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 31(1):72-86.
- Sultana, R., A. J. McBain, and C. A. O'Neill.** 2013. Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by *lactobacillus* and *bifidobacterium* lysates. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(16):4887-4894.
- Sutra, L., and B. Poutrel.** 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40:79-89.
- Szajewska, H.** 2011. Short- and long-term effects of probiotics administered early in life. *Nestle. Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.* 68:65-78.

T

- Tacchi, L., R. Bickerdike, A. Douglas, C. J. Secombes, and S. A. Martin.** 2011. Transcriptomic responses to functional feeds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 31(5):704-715.
- Tamime, A. Y.** 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56(S4):S2-S15.
- Tan, H. H., Y. K. Tay, and C. L. Goh.** 1998. Bacterial skin infections at a tertiary dermatological centre. *Singapore Med. J.* 39(8):353-356.
- Taponen, S., J. Bjorkroth, and S. Pyorala.** 2008. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *J. Dairy Res.* 75(4):422-429.

- Taponen, S., and S. Pyorala.** 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet. Microbiol. 134(1-2):29-36.
- Taras, D., W. Vahjen, M. Macha, and O. Simon.** 2006. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. J. Anim Sci. 84(3):608-617.
- Tatusov, R. L., M. Y. Galperin, D. A. Natale, and E. V. Koonin.** 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. Nucleic Acids Res. 28(1):33-36.
- Teixeira, T. F., M. C. Collado, C. L. Ferreira, J. Bressan, and M. C. Peluzio.** 2012. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. Nutr. Res. 32(9):637-647.
- Tennyson, C. A., and G. Friedman.** 2008. Microecology, obesity, and probiotics. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 15(5):422-427.
- Teughels, W., E. M. Van, I. Sliepen, and M. Quirynen.** 2008. Probiotics and oral healthcare. Periodontol. 2000. 48:111-147.
- Tewari, A. K., and B. R. Maharana.** 2011. Control of poultry coccidiosis: changing trends. J. Parasit. Dis. 35(1):10-17.
- Thirabunyanon, M., and N. Thongwittaya.** 2011. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. Res. Vet. Sci. 93(1):74-81.
- Thormar, H.** 2012. Patented non-antibiotic agents as animal feed additives. Recent Pat. Food Nutr. Agric. 4(2):155-168.
- Thompson JR.** 1984. Genetic interrelationships of parturition problems and production. J. Dairy Sci. 67(3):628-35.
- Timmerman, H. M.** 2006. [Together strong: probiotics to promote health in people and animals]. Tijdschr. Diergeneesk. 131(19):697-700.
- Tormo-Mas, M. A., I. Mir, A. Shrestha, S. M. Tallent, S. Campoy, I. Lasa, J. Barbe, R. P. Novick, G. E. Christie, and J. R. Penades.** 2010. Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. Nature 465(7299):779-782.
- Tran Van, N. G., and R. R. Isberg.** 1993. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. EMBO J. 12(5):1887-1895.
- Trouillet, S., J. P. Rasigade, Y. Lhoste, T. Ferry, F. Vandenesch, J. Etienne, and F. Laurent.** 2011. A novel flow cytometry-based assay for the quantification of

Staphylococcus aureus adhesion to and invasion of eukaryotic cells. J. Microbiol. Methods 86(2):145-149.

Tsai, Y. T., P. C. Cheng, and T. M. Pan. 2012. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96(4):853-862.

Tuchscher, L.P., Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Lee, J.C., Sordelli, D.O., 2008. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. Infect. Immun. 76:5738-5744.

Turpin, W., C. Humblot, M. Thomas, and J. P. Guyot. 2010. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. Int. J. Food Microbiol. 143(3):87-102.

U

Ulluwishewa, D., R. C. Anderson, W. C. McNabb, P. J. Moughan, J. M. Wells, and N. C. Roy. 2011. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. J. Nutr. 141(5):769-776.

V

Vaarala, O. 2003. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. Clin. Exp. Allergy 33(12):1634-1640.

Vahjen, W., D. Taras, and O. Simon. 2007. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets. Curr. Issues Intest. Microbiol. 8(1):1-7.

van de Guchte M, T. Chaze, G. Jan, and M. Y. Mistou. 2012. Properties of probiotic bacteria explored by proteomic approaches. Curr. Opin. Microbiol. 15(3):381-389.

van den Borne, B. H., M. Nielen, S. G. van, M. B. Melchior, T. J. Lam, and R. N. Zadoks. 2010. Host adaptation of bovine *Staphylococcus aureus* seems associated with bacteriological cure after lactational antimicrobial treatment. J. Dairy Sci. 93(6):2550-2558.

Van Nhieu, G. T., E. S. Krukoni, A. A. Reszka, A. F. Horwitz, and R. R. Isberg. 1996. Mutations in the cytoplasmic domain of the integrin beta1 chain indicate a role for endocytosis factors in bacterial internalization. J. Biol. Chem. 271(13):7665-7672.

van Wamel, W. J., S. H. Rooijackers, M. Ruyken, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and

- chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. J. Bacteriol. 188(4):1310-1315.
- Van, I. F., B. J. De, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle.** 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. Avian Pathol. 33(6):537-549.
- Van, I. F., J. B. Russell, M. D. Flythe, I. Gantois, L. Timbermont, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle.** 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathol. 35(3):182-188.
- Vandeplas, S., D. R. Dubois, Y. Beckers, P. Thonart, and A. Thewis.** 2010. *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. J. Food Prot. 73(4):774-785.
- Vanderpool, C., F. Yan, and D. B. Polk.** 2008. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. Inflamm. Bowel. Dis. 14(11):1585-1596.
- Vann, J. M., and R. A. Proctor.** 1988. Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* alpha-hemolysin. Microb. Pathog. 4(6):443-453.
- Varez-Olmos, M. I., and R. A. Oberhelman.** 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. Clin. Infect. Dis. 32(11):1567-1576.
- Varma, P., N. Nisha, K. R. Dinesh, A. V. Kumar, and R. Biswas.** 2011. Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 20(3):137-143.
- Vaughan, E. E., and B. Mollet.** 1999. Probiotics in the new millennium. Nahrung 43(3):148-153.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Huard, C., Pepin, M.,** 2003. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. Vet. Microbiol. 96:69-79.
- Veerappan, G. R., J. Betteridge, and P. E. Young.** 2012. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. Curr. Gastroenterol. Rep. 14(4):324-333.
- Velez, M. P., S. C. De Keersmaecker, and J. Vanderleyden.** 2007. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. FEMS Microbiol. Lett. 276(2):140-148.
- Velraeds, M. M., van de Belt-Gritter B, H. C. van der Mei, G. Reid, and H. J. Busscher.** 1998. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. J. Med. Microbiol. 47(12):1081-1085.

- Ventura, M., S. O'Flaherty, M. J. Claesson, F. Turroni, T. R. Klaenhammer, S. D. van, and P. W. O'Toole.** 2009. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(1):61-71.
- Verdier-Metz, I., V. Michel, C. Delbes, and M. C. Montel.** 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* 26(3):305-310.
- Verdier-Metz, I., G. Gagne, S. Bornes, F. Monsallier, P. Veisseire, C. bes-Paus, and M. C. Montel.** 2012. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(2):326-333.
- Vesterlund, S., M. Karp, S. Salminen, and A. C. Ouwehand.** 2006. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology* 152(6):1819-1826.
- Viana, D., J. Blanco, M. A. Tormo-Mas, L. Selva, C. M. Guinane, R. Baselga, J. Corpa, I. Lasa, R. P. Novick, J. R. Fitzgerald, and J. R. Penades.** 2010a. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol. Microbiol.* 77(6):1583-1594.
- Viana, D., L. Selva, J. J. Callanan, I. Guerrero, S. Ferrian, and J. M. Corpa.** 2010b. Strains of *Staphylococcus aureus* and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits. *Vet. J.* 190(3):403-407.
- Viçosa GN, Le Loir A, Le Loir Y, de Carvalho AF, Nero LA.** 2013. egc characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Int J. Food Microbiol.* 165(3):227-30.
- Vijaya Kumar, S. G., S. K. Singh, P. Goyal, N. Dilbaghi, and D. N. Mishra.** 2005. Beneficial effects of probiotics and prebiotics on human health. *Pharmazie* 60(3):163-171.
- Visser, Y. M., J. Snel, P. F. Zuurendonk, M. Kleerebezem, H. J. Wichers, and H. F. Savelkoul.** 2011. *Lactobacillus* strains differentially modulate cytokine production by hPBMC from pollen-allergic patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61(1):28-40.
- Vitkov, M., and P. Ivanov.** 1981. [Antigenic structural studies of *S. aureus* strains in mastitis in cows]. *Vet. Med. Nauki* 18(1):44-48.
- Vlamakis H., Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick, R. Kolter.** 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:157-168.
- von, Eiff. C., G. Peters, and K. Becker.** 2006. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury.* 37(S2):S26-S33.
- Vosough, A. B., A. G. Velthuis, H. Hogeveen, and R. B. Huirne.** 2006. Simulating *Escherichia coli* O157:H7 transmission to assess effectiveness of interventions in Dutch dairy-beef slaughterhouses. *Prev. Vet. Med.* 77(1-2):15-30.

Vuong, C., J. M. Voyich, E. R. Fischer, K. R. Braughton, A. R. Whitney, F. R. DeLeo, and M. Otto. 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 6(3):269-275.

W

Wagner, R. D. 2008. Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research. *Adv. Exp. Med. Biol.* 635:41-56.

Walker, W. A. 2000. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30(S2):S2-S7.

Wall, R. J., A. M. Powell, M. J. Paape, D. E. Kerr, D. D. Bannerman, V. G. Pursel, K. D. Wells, N. Talbot, and H. W. Hawk. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* 23(4):445-451.

Wallace, T. C., F. Guarner, K. Madsen, M. D. Cabana, G. Gibson, E. Hentges, and M. E. Sanders. 2011. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev.* 69(7):392-403.

Wallemacq H., B. Girard, P. Lekeux and F. Bureau. 2010. La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. *Ann. Méd. Vét.* 154:16-29.

Walters, A. H. 1984. Probiotics in modern meat production. *J. R. Soc. Health* 104(6):220-224, 228.

Wang, J. H., Y. J. Zhou, and P. He. 2010. *Staphylococcus aureus* induces apoptosis of human monocytic U937 cells via NF-kappaB signaling pathways. *Microb. Pathog.* 49(5):252-259.

Wang, L. H., X. Y. Li, L. J. Jin, J. S. You, Y. Zhou, S. Y. Li, and Y. P. Xu. 2011. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* 149(3-4):415-421.

Wang, J., and H. A. Sampson. 2012. Treatments for food allergy: how close are we? *Immunol. Res.* 54(1-3):83-94.

Wang, J. H., K. Zhang, N. Wang, X. M. Qiu, Y. B. Wang, and P. He. 2013a. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in beta1 integrin-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* by alveolar epithelial cells. *J. Microbiol.* 51(5):644-650.

Wang, Y., B. N. Ametaj, D. J. Ambrose, and M. G. Ganzle. 2013b. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC. Microbiol.* 13:19.

- Watanabe, T., H. Nishio, T. Tanigawa, H. Yamagami, H. Okazaki, K. Watanabe, K. Tominaga, Y. Fujiwara, N. Oshitani, T. Asahara, K. Nomoto, K. Higuchi, K. Takeuchi, and T. Arakawa.** 2009. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297(3):G506-G513.
- Watkins, R. L., K. B. Pallister, and J. M. Voyich.** 2011. The SaeR/S Gene Regulatory System Induces a Pro-Inflammatory Cytokine Response during *Staphylococcus aureus* Infection. *PLoS. One.* 6(5):e19939.
- Wellnitz O, Kerr DE.** 2004. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 101(3-4):191-202.
- Wellnitz, O., and R. M. Bruckmaier.** 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet. J.* 192(2):148-152.
- Wesson, C. A., L. E. Liou, K. M. Todd, G. A. Bohach, W. R. Trumble, and K. W. Bayles.** 1998. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 66(11):5238-5243.
- Wesson, C. A., J. Deringer, L. E. Liou, K. W. Bayles, G. A. Bohach, and W. R. Trumble.** 2000. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect. Immun.* 68(5):2998-3001.
- West, N. P., D. B. Pyne, J. M. Peake, and A. W. Cripps.** 2009. Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exerc. Immunol. Rev.* 15:107-126.
- Whelehan, C. J., K. G. Meade, P. D. Eckersall, F. J. Young, and C. O'Farrelly.** 2010. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140(3-4):181-189.
- White DG, Harmon RJ, Matos JE, Langlois BE.** 1989. Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. *J. Dairy Sci.* 72(7):1886-1892.
- White, B. A., D. J. Creedon, K. E. Nelson, and B. A. Wilson.** 2011. The vaginal microbiome in health and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 22(10):389-393.
- Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM, Morrison WI, Fitzgerald JR.** 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog.* 7(10):e1002271.
- Witkin SS, I.M. Linhares and P. Giraldo.** 2007. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21(3):347-54
- Won, T. J., B. Kim, D. S. Song, Y. T. Lim, E. S. Oh, D. I. Lee, E. S. Park, H. Min, S. Y. Park, and K. W. Hwang.** 2011. Modulation of Th1/Th2 balance by *Lactobacillus*

strains isolated from Kimchi via stimulation of macrophage cell line J774A.1 *In Vitro*. J. Food Sci. 76(2):H55-H61.

Woodward WD, Besser TE, Ward AC, Corbeil LB. 1987. *In vitro* growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. Can. J. Vet. Res. 51(1):27-31.

Wu J, Hu S, Cao L. 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. Antimicrob. Agents Chemother. 51(9):3131-3135.

Y

Yamasaki, O., J. Kaneko, S. Morizane, H. Akiyama, J. Arata, S. Narita, J. Chiba, Y. Kamio, and K. Iwatsuki. 2005a. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. Clin. Infect. Dis. 40(3):381-385.

Yamasaki, O., S. Morizane, H. Akiyama, K. Iwatsuki, J. Kaneko, and Y. Kamio. 2005b. Tendon destruction induced by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in a patient with Sezary syndrome. Br. J. Dermatol. 152(3):586-587.

Yamawaki, R. A., E. L. Milbradt, M. P. Coppola, J. C. Rodrigues, R. L. ndreatti Filho, C. R. Padovani, and A. S. Okamoto. 2013. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella Enteritidis* after hatch. Poult. Sci. 92(6):1560-1563.

Yanagihara, S., T. Hirota, and N. Yamamoto. 2012. Transcriptional response of *Lactobacillus acidophilus* L-92 after attachment to epithelial Caco-2 cells. J. Biosci. Bioeng. 114(6):582-585.

Yang, J., Y. Sang, K. G. Meade, and C. Ross. 2011. The role of oct-1 in the regulation of tracheal antimicrobial peptide (TAP) and lingual antimicrobial peptide (LAP) expression in bovine mammary epithelial cells. Immunogenetics 63(11):715-725.

Yang, J., X. Liang, and Y. Ji. 2013. The mutated staphylococcal H35A alpha-toxin inhibits adhesion and invasion of *Staphylococcus aureus* and group A streptococci. Virulence 4(1):77-81.

Yang, W., H. Zerbe, W. Petzl, R. M. Brunner, J. Gunther, C. Draing, A. S. von, H. J. Schuberth, and H. M. Seyfert. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. Mol. Immunol. 45(5):1385-1397.

Yang, Z., Y. Fu, B. Liu, Z. Ershun, Z. Liu, X. Song, D. Li, and N. Zhang. 2013. Farrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. Microb. Pathog. 5:1-6.

- Yao, L., V. Bengualid, F. D. Lowy, J. J. Gibbons, V. B. Hatcher, and J. W. Berman.** 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* 63(5):1835-1839.
- Yarus, S., J. M. Rosen, A. M. Cole, and G. Diamond.** 1996. Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14118-14121.
- Yarwood, J. M., and P. M. Schlievert.** 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* 112(11):1620-1625.
- Yeung, C. Y., J. S. Chiang Chiau, W. T. Chan, C. B. Jiang, M. L. Cheng, H. L. Liu, and H. C. Lee.** 2013. *In vitro* prevention of *salmonella* lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various *lactobacillus* strains. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2013:973209.
- Younes, J. A., H. C. van der Mei, H. E. van den, H. J. Busscher, and G. Reid.** 2012. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS. One.* 7(5):e36917.
- Young, C. W., V. R. Eidman, and J. K. Reneau.** 1985. Animal health and management and their impact on economic efficiency. *J. Dairy Sci.* 68(6):1593-1602.
- Yu, C., Z. R. Shi, C. Y. Chu, K. H. Lee, X. Zhao, and J. W. Lee.** 2010. Expression of bovine granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2) in neutrophils and a mammary epithelial cell line (MAC-T) in response to various bacterial cell wall components. *Vet. J.* 186(1):89-95.
- Yu, Z., X. Zhang, S. Li, C. Li, D. Li, and Z. Yang.** 2013. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29(3):489-498.

Z

- Zadoks, R. N., J. R. Middleton, S. McDougall, J. Katholm, and Y. H. Schukken.** 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 16(4):357-372.
- Zárate G., and M. E. Nader-Macias.** 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2):174-180.
- Zárate G., V. Santos and M.E. Nader-Macias.** 2009. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2009:48358.

- Zavizion, B., R. C. Gorewit, and I. Politis.** 1995. Subcloning the MAC-T bovine mammary epithelial cell line: morphology, growth properties, and cytogenetic analysis of clonal cells. *J. Dairy Sci.* 78(3):515-527.
- Zhang, J. S., J. D. Yin, X. Zhou, F. N. Li, J. J. Ni, and B. Dong.** 2008. Effects of lower dietary lysine and energy content on carcass characteristics and meat quality in growing-finishing pigs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 21:1785-1793.
- Zhang, W., D. Yu, Z. Sun, R. Wu, X. Chen, W. Chen, H. Meng, S. Hu, and H. Zhang.** 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional homemade koumiss in Inner Mongolia, China. *J. Bacteriol.* 192(19):5268-5269.
- Zhang, Z. F., and I. H. Kim.** 2013. Effects of probiotic supplementation in different energy and nutrient density diets on performance, egg quality, excreta microflora, excreta noxious gas emission, and serum cholesterol levels in laying hens. *J. Anim Sci.* 91(10):4781-4787.
- Zhang, J. L., Q. M. Xie, J. Ji, W. H. Yang, Y. B. Wu, C. Li, J. Y. Ma, and Y. Z. Bi.** 2012. Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens. *Poult. Sci.* 91(11):2755-2760.
- Zhang, W., H. Wang, J. Liu, Y. Zhao, K. Gao, and J. Zhang.** 2013. Adhesive ability means inhibition activities for *lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe.* 22:97-103.
- Zhao, K., H. Y. Liu, M. M. Zhou, and J. X. Liu.** 2010. Establishment and characterization of a lactating bovine mammary epithelial cell model for the study of milk synthesis. *Cell Biol. Int.* 34(7):717-721.
- Zhao, L.** 2013. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat. Rev. Microbiol.* 11(9):639-647.
- Zhao, X., and P. Lacasse.** 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim Sci.* 86(S13):57-65.
- Ziv, G., M. J. Paape, and A. M. Dulin.** 1983. Influence of antibiotics and intramammary antibiotic products on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes. *Am. J. Vet. Res.* 44(3):385-388.
- Zoetendal, E. G., E. E. Vaughan, and W. M. de Vos.** 2006. A microbial world within us. *Mol. Microbiol.* 59(6):1639-1650.

Références en ligne

Bidaud O., P. Houffschmitt and Y. Viguerie. 2007. Etiologie des mammites bovines en France entre 2005 et 2007. www.au-au-coeur-du-lait.fr/newsletter/poster_jbn.pdf.

FAO/CNIEL. L'économie laitière en chiffre. 2013. www.calameo.com

INSERM. Les infections nosocomiales. www.inserm.fr/thematiques

Résumé.

Staphylococcus aureus est un des pathogènes majeurs impliqués dans les mammites chez les ruminants. Il engendre des tableaux cliniques très variables, allant des mammites subcliniques aux mammites gangréneuses, mais les mécanismes de cette variabilité restent encore mal connus. La volonté de réduire l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire ainsi que leurs faibles efficacités contre les mammites staphylococciques justifient les efforts consentis au développement de stratégies alternatives. L'une des particularités des infections intramammaires à *S. aureus* est leur chronicité et leur persistance dont l'une des principales causes est la capacité de *S. aureus* à adhérer et internaliser dans les tissus de l'hôte. Utiliser les propriétés inhibitrices des bactéries dites « probiotiques » d'un écosystème pour réduire, prévenir ou traiter des infections est une stratégie qui a déjà montré de bons résultats chez l'homme. Ce travail de thèse vise à mieux caractériser le microbiote mammaire et notamment la composante lactique et à évaluer son potentiel à moduler l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales mammaires bovines. L'ensemble de ce travail a été réalisé avec deux souches de *S. aureus* très différentes au niveau des tableaux cliniques engendrés. La souche RF122, très virulente, et la souche Newbould 305, induisant des infections modérées et chroniques. Les résultats obtenus montrent que la capacité d'invasion cellulaire semble être un élément clé dans la chronicité de la souche Newbould 305. Ceci a été montré par l'analyse comparative (génomiques, protéomiques et phénotypes) des souches Newbould 305 et RF122. D'autre part, l'écosystème de la glande mammaire présente une composante lactique ayant des capacités probiotiques intéressantes. Ceci a été montré *in vitro* sur un modèle d'interaction tripartite, entre *S. aureus*, *Lactobacillus casei* et les cellules épithéliales mammaires MAC-T. Dans ce système, *L. casei* affecte l'adhésion et surtout l'internalisation de *S. aureus* sans modifier la viabilité et la morphologie des cellules en culture. L'inhibition semble dépendante d'un contact direct avec des *L. casei* viables. La caractérisation des bases moléculaires de ces phénomènes se poursuit dans l'équipe. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans l'application de bactéries lactiques en tant que probiotique mammaire.

Mots clefs : Mammites, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, Adhésion, Internalisation, MAC-T

Abstract.

Staphylococcus aureus is one of the main pathogens involved in ruminant mastitis. Severity of bovine *S. aureus* mastitis is highly variable, from subclinical to gangrenous mastitis. Nevertheless *S. aureus* factors that may explain this variability are still poorly documented. There is a great demand for the reduction of antibiotics use in veterinary medicine. Besides, these antibiotics have a low efficiency against staphylococcal mastitis. There is thus a need to develop alternative strategies. One feature of *S. aureus* is its ability to persist within the mammary tissue and induce chronicity of the infection. One of the main causes is the *S. aureus* ability to adhere to and internalize into host cells. The concept of biological control, using natural inhibitory properties of lactic acid bacteria (LAB) as probiotics, is now well established in humans and animals and is used to reduce, prevent or treat bacterial infections. This PhD work aims to better characterize the mammary microbiota in particular its LAB population, which might exert a positive effect on host health, and to determine its potential to modulate adhesion and internalization of *S. aureus*. This work was realized using two *S. aureus* strains as representatives of strains inducing severe (*S. aureus* RF122) or mild and chronic (Newbould 305) mastitis. Our results showed that the cellular invasion capacities seems to be key element in the chronicity observed in Newbould 305 mastitis. This was determined by genomic, proteomic and phenotypic comparison with RF122. Besides, we showed that the bovine mammary ecosystem present a LAB biodiversity and that these LAB presented interesting probiotic capacities. This was shown in an *in vitro* model of tripartite interaction, between *S. aureus*, *Lactobacillus casei* and the mammary epithelial cells MAC-T. In this system, *L. casei* impairs *S. aureus* adhesion and internalization without modifying the viability and the morphology of cells. The inhibition depends on a direct contact with live *L. casei*. Identification of the molecular basis of this inhibition are currently under investigation. These results open new perspectives in the application of lactic acid bacteria as mammary probiotics.

Key-words : Mastitis, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, Adhesion, Internalization, MAC-T